



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Utilidad de muestras clínicas de pacientes para realizar
estudios de variabilidad genética de *Leishmania (V.)
braziliensis*, procedentes de diferentes departamentos
del Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Erika Sofía PÉREZ VÉLEZ

ASESOR

Mg. Rosa MARTÍNEZ ROJAS

Lima, Perú

2019

Referencia bibliográfica

Pérez, E. (2019). *Utilidad de muestras clínicas de pacientes para realizar estudios de variabilidad genética de Leishmania (V.) braziliensis, procedentes de diferentes departamentos del Perú*. Tesis para optar grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

METADATOS COMPLEMENTARIOS

- 1. Código ORCID del autor : 0000-0001-8341-7802**
- 2. Código ORCID del asesor : 0000-0002-5100-0452**
- 3. DNI del autor : 43208447**
- 4. Grupo de investigación : no aplica**
- 5. Institución que financia parcial o total la investigación:** Este proyecto se ha desarrollado como parte del protocolo de investigación NMRC.D.2007.0018 que ha sido aprobado por el Comité de Ética de NAMRU-6 y financiado por GEIS 847705.82000. 256B. B0016 y la beca de entrenamiento NIH/FIC D43 TW007393
- 6. Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:**

Latitud : -12.058502 | Longitud : -77.088916
- 7. Año o rango de años: 2014**

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 170-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las...16:00... horas del día 03.06.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Mg.	Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre	e integrado por
Dr.	Juan Atilio Jiménez Chunga	(Miembro)
Dr.	Jaime Roberto Sánchez Venegas	(Miembro)
Mg.	Rosa Nérida Martínez Rojas	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **ERIKA SOFÍA PÉREZ VÉLEZ**.

Después de darse lectura al Expediente N° 170-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“UTILIDAD DE MUESTRAS CLINICAS DE PACIENTES PARA REALIZAR ESTUDIOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Leishmania (V.) braziliensis* PROCEDENTES DE DIFERENTES DEPARTAMENTOS DEL PERÚ”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Muy Bueno con la nota de 17

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular a la Bachiller **ERIKA SOFÍA PÉREZ VÉLEZ**

Siendo las 18:25 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 03 días del mes de junio del año 2019.

Mg. Débora E. Alvarado Iparaguirre
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 15475

Mg. Rosa Nériida Martínez Rojas
Profesora Principal a T. C.
ASESOR
REGINA N° 15510

Dr. Juan Atilio Jiménez Chunga
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 13849

Dr. Jaime Roberto Sánchez Venegas
Profesor Asociado a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 15705

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer a Dios y a la Virgen por ser mi apoyo constante durante mi formación personal y profesional.

Al “Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales de la Marina de los EE.UU (NAMRU-6)” en especial a todo el personal del Departamento de Parasitología, por haber contribuido a desarrollar mis destrezas que acarrea la culminación de una etapa.

A los Doctores Maxy De los Santos y Willy Lescano por su invaluable asesoría, dedicación y enseñanza en bien del desarrollo de la investigación.

A la Mg. Rosa Martínez Rojas asesora de esta tesis quien a pesar de mi dificultad horaria siempre supo ayudarme y guiarme con el desarrollo de esta investigación.

A Jorge Rodríguez y Giancarlo Ganggini, quienes maximizando su esfuerzo supieron tenderme una mano.

Finalmente, *mi gratitud* por la confianza a todos los pacientes quienes proporcionaron sus muestras para realizar esta investigación.

Este proyecto se ha desarrollado como parte del protocolo de investigación NMRCD.2007.0018 que ha sido aprobado por el Comité de Ética de NAMRU-6 y financiado por GEIS 847705.82000. 256B. B0016 y la beca de entrenamiento NIH/FIC D43 TW007393.

A Dios y a la Virgen ya que en los momentos de angustia fueron mi templanza

A mis padres Víctor Hugo y Blanca Margarita, mis hermanos Sandro y Carla que en todo momento se preocuparon, me impulsaron o simplemente preguntaron sobre el desarrollo de esta tesis, gracias por creer en mí y apoyar mi decisión de haber venido a Lima a estudiar esta maestría ustedes nunca dudaron de mis capacidades

Finalmente, a Emilia mi pequeña sobrina que con su sonrisa haces que mi mundo se ilumine.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Género <i>Leishmania</i>	4
2.2 Posición taxonómica.	4
2.3 Epidemiología de la Leishmaniasis en Perú	5
2.4 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	6
2.5 Aspectos clínicos	7
2.6 Tratamiento de <i>Leishmania</i>	10
2.7 Genoma de <i>Leishmania</i>	11
2.8 Variabilidad genética de <i>Leishmania</i>	11
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Diseño de estudio	17
4.2 Declaración ética	17
4.3 Lugares de colecta de las muestras	17
4.4 Toma de muestra, almacenamiento y transporte	21
4.5 Cultivo y crecimiento en masa de parásitos	21
4.6 Extracción de ADN de las muestras	22
4.7 Determinación de la concentración de ADN total	24
4.8 PCR de los marcadores microsatélites	24
4.9 Electroforesis en capilar	25
4.10 Análisis de microsatélites	26
4.11 Análisis de datos	27
V. RESULTADOS	31
5.1 Identificación de fragmentos mediante electroforesis capilar	31
5.2 Porcentaje de amplificación de los fragmentos satélites clasificados según alelos, procedencia y tipo de muestras clínicas.	33
5.3 Análisis inferencial	36

5.4	Determinación de la diversidad genética en <i>L. (V.) braziliensis</i>	38
5.5	Análisis de la estructura poblacional de <i>L. (V.) braziliensis</i>	40
VI.	DISCUSIÓN	45
VII.	CONCLUSIONES	50
VIII.	RECOMENDACIONES	51
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
X.	ANEXOS	60
XI.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	64

ABREVIATURAS

OMS:	Organización Mundial de la Salud
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
RAPD:	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos
RFLP:	Análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
MLMT:	Tipificación de microsatélites multilocus
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>L. (V.) braziliensis:</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. (L.) amazonensis:</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
MINSA:	Ministerio de Salud
DGE:	Dirección General de Epidemiología
ADNk:	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
ARNg:	Ácido ribonucleico guía
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
MLEE:	Electroforesis de enzimas multilocus
FAO:	Food and Agriculture Organization
KDa:	Kilodaltons
NAMRU-6:	Naval Medical Research Unit No 6, sede Lima.
HMC:	Hospital Militar Central
HAI:	Hospital de Apoyo Iquitos
Nested RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real anidada
MDD:	Madre de Dios
DMSO:	Dimetil sulfóxido
PBS:	Buffer fosfato salino
ANOVA	Análisis de varianza
N_A:	Número de alelos
H_o	Heterocigocidad observada

<i>H_E</i>	Heterocigocidad esperada
PIC	Contenido de Información polimórfica
AC52 O AC5, ARP, LBA, E11, IBH, CAK, LRC, G09, EMI	Denominación de los cebadores de reacción para microsatélites
FCA	Análisis Factorial de Correspondencia

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Reporte de casos de leishmaniasis a nivel nacional en los departamentos de Madre de Dios, Cusco, Cajamarca, Junín, Amazonas desde el 2009 hasta la semana epidemiológica 52 del 2018	6
Tabla 2: Listado de muestras biológicas utilizadas en el presente estudio según Procedencia y tipo de muestra clínica obtenida	18
Tabla 3: Cebadores utilizados para el análisis de microsatélites	25
Tabla 4: Agrupamiento de marcadores microsatélites	26
Tabla 5: Porcentaje global de amplificación de muestra según muestra clínica y marcadores	34
Tabla 6: Porcentaje de amplificación de los nueve fragmentos microsatélites según origen geográfico	35
Tabla 7: Número y porcentaje de coincidencias entre el cluster de las muestras clínicas alternativas	37
Tabla 8: Índices de diversidad y PIC de cultivo y muestras clínicas alternativas agrupadas	39
Tabla 9: Proporción de parentesco de las poblaciones geográficas predefinida	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Macrófagos infectados por amastigotes de <i>Leishmania</i> spp	7
Figura 2: Promastigotes de <i>Leishmania</i> , teñidos con colorante Giemsa	7
Figura 3: Leishmaniasis cutánea: Lesión cutánea ulcerosa donde se observan los bordes levantados, indurados y definidos	9
Figura 4: Leishmaniasis mucocutánea: Se observa la pérdida de la úvula	10
Figura 5: Procedencia de las muestras de estudio por departamento	20
Figura 6: Electroferograma del marcador de peso molecular GeneScan™-350 ROX™	27
Figura 7: Electroforegrama de una muestra usando el Panel A	32
Figura 8: Electroforegrama de una muestra usando el Panel B	32
Figura 9: Electroforegrama de una muestra usando el Panel C	33
Figura 10: Porcentaje de eficiencia de amplificación promedio global según origen geográfico y tipo de muestra	36
Figura 11: Porcentaje de coincidencias entre el cluster de las muestras clínicas alternativas versus el estándar clasificado según alelos 1 y 2	37
Figura 12: Porcentaje de coincidencia total entre el cluster de las muestras clínicas alternativas con sus respectivas muestras estándar	38
Figura 13: Diferencias de HE y PIC entre cultivos y otras muestras clínicas alternativas	40
Figura 14: Derivada de número posible de poblaciones para muestras de <i>L.(V.) braziliensis</i> .	41
Figura 15: Agrupación genética de las muestras según localización geográfica	42
Figura 16: Representación del grado de similitud alélica para cultivos	42
Figura 17: Representación del grado de similitud alélica para biopsias	43
Figura 18: Representación del grado de similitud alélica para muestras de impronta con papel filtro	43
Figura 19: Representación del grado de similitud alélica para raspados con lancetas	44

Figura 20: Dendograma Neighbor Joining basado en la distancia genética de Nei en la población de *L. (V.) braziliensis*, utilizando cultivos

44

RESUMEN

Los estudios de variabilidad genética describen la variabilidad usando cultivos como fuente primaria de muestra lo que permite obtener una alta calidad de ADN del parásito. Sin embargo el establecimiento del cultivo requiere un procedimiento invasivo de muestreo y personal altamente entrenado para evitar la contaminación bacteriana de los medios usados para aislar el parásito.

Pocas investigaciones se han realizado usando muestras alternativas en estudios de variabilidad genética demostrando su utilidad frente a los cultivos, por ello, se determinó la utilidad de improntas en papel filtro, raspados por lanceta y biopsias para evaluar los parámetros de genética de poblaciones en *Leishmania*.

El material genético fue extraído de todos los tipos de muestra y se caracterizó los aislados de leishmaniasis como *L. (V.) braziliensis* usando la técnica de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en una PCR en tiempo real anidada de 42 cultivos aislados de pacientes y 78 muestras clínicas (improntas, aspirados y biopsias). Luego se realizó la PCR de microsatélites a cada muestra clínica usando 9 marcadores polimórficos marcados con compuestos fluorescentes de tipo 6-FAM, HEX y NED mediante electroforesis capilar en el analizador genético 3130xl. Finalmente, los electroforegramas fueron analizados usando el software Gene mapper v4.0; los índices de heterocigosidad observada y esperada, número promedio de alelos, estructura poblacional y distancias genéticas fueron realizadas usando el software Cervus v3.0.6, Structure v2.1 y Population v1.2.32

La comparación entre los tipos de muestra mostró que las improntas en papel filtro, raspados y biopsias tuvieron menor resolución que los cultivos para obtener análisis genéticos precisos, este hallazgo puede deberse al escaso material del parásito en muestras clínicas primarias. Nuestros resultados indican que la utilidad de muestras clínicas primarias para el análisis de microsatélites es limitada en comparación a los cultivos que presentan mayor resolución y facilitan las pruebas de variabilidad genética.

Palabras clave: Diversidad genética, muestras clínicas, utilidad de muestras, *Leishmania*, *Leishmania (V.) braziliensis*

ABSTRACT

Multi Locus Microsatellite Typing to describe/determine genetic variability of *Leishmania* rely on cultures as the primary source of samples which allows to obtain high quality ADN from parasite. However, parasite cultures require an invasive collection procedure and highly trained staff to avoid contamination.

Few studies have been conducted to assess the usefulness of alternative sample types for genetic variability studies in comparison to parasite cultures. Therefore, our study aimed to explore the usefulness of filter paper imprints, lancet scraping and biopsies to assess genetic population parameters in *Leishmania*.

The genetic material was extracted from all types of samples and we employed a FRET based Nested Real Time PCR to identify *Leishmania (V.) braziliensis* on 42 parasite cultures isolates and 78 clinical samples (biopsies, imprints and scrappings). Then we performed microsatellite typing using 9 highly polymorphic markers labelled with 6-FAM, HEX, and NED by capillary electrophoresis in 3130xl Genetic Analyzer. Finally, electrophoregrams were analyzed using Gene Mapper v4.0 software and different genetic diversity indexes such expected and observed heterozygosity, mean number of alleles, population structure and genetic distances were computed using Cervus v3.0.6, STRUCTURE v2.1 and Populations v1.2.32 softwares.

The comparison between sample types showed that filter paper imprints, scraps and biopsies had a lower resolution than cultures for accurate population genetic analyses. This finding might be due to the scarce genetic material of the parasite in primary clinical samples.

Our results indicated that the usefulness of primary clinical samples for fragment length polymorphism analyses is limited in comparison with parasite cultures which have a higher resolution and facilitate tests of genetic variability.

Key words: Genetic diversity, clinical samples, sample utility, *Leishmania*, *Leishmania (V.) braziliensi*

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria originada por un protozoo dimórfico del género *Leishmania*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es considerada una de las siete enfermedades olvidadas a nivel mundial y presenta aproximadamente dos millones de nuevos casos anuales y 12 millones de afectados en todo el mundo (WHO, 2007). La leishmaniasis presenta una amplia gama de síntomas clínicos: lesiones ulcerativas, nódulos no ulcerativos, inflamación y/o destrucción de las mucosas e infección visceral (Reithinger *et al.*, 2007) y de acuerdo a la OMS, se presentan diferentes características clínicas según la especie de parásito infectante (WHO, 2010).

Perú es uno de los países que presenta mayor número de incidencia de casos de leishmania cutánea y mucosa en las Américas (WHO, 2013). Para el año 2018 se han reportado alrededor de 6000 casos incluyendo lesiones de tipo cutáneas y mucosas y los departamentos de Madre de Dios y Cusco son los que presentan más casos según la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud (DGE, 2018). En estos departamentos, el riesgo de contraer la enfermedad es elevado debido a los cambios ambientales producidos por el hombre. La migración motivada por factores económicos y sociales ha generado la entrada de personas hacia zonas boscosas no exploradas, incrementando la presentación humana frente al vector y favoreciendo la adaptación de *Leishmania* a diferentes hospederos vertebrados y vectores (Garin *et al.*, 2001; Neyra, 1997; Rotureau *et al.*, 2006; Vidyashankar *et al.*, 2002).

A nivel mundial se han descrito más de 20 especies para el género *Leishmania*, que infectan al hombre las cuales son idénticas morfológicamente. La diversidad fenotípica se observa no sólo entre especies, sino también en niveles de virulencia entre los clones (Garin *et al.*, 2001) que, tras la interacción con la respuesta inmunológica del hospedero, contribuye a determinar características clínicas que afecta la eficiencia de la terapia aplicada (Arévalo *et al.*, 2007). La comprensión de la leishmaniasis y el desarrollo de medidas para contrarrestar su propagación, dependen de la capacidad de identificar las especies de *Leishmania* y caracterizar variantes genéticas (Boité *et al.*, 2012).

Las variantes génicas se pueden evaluar con alta resolución, mediante el secuenciamiento completo del genoma de diferentes aislamientos de poblaciones del parásito. Sin embargo, esta técnica es compleja porque requiere de personal entrenado y calificado, por lo cual se han desarrollado métodos alternativos basados en *fingerprints* de ADN que presenta alta sensibilidad para la detección directa de parásitos que infectan tejidos humanos, animales y de vectores, (Bañuls *et al.*, 2007). Entre estas alternativas se encuentra la amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD), el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la tipificación de microsatélites multilocus (Multi-locus Microsatellite Typing, MLMT).

La tipificación mediante MLMT se basa en la detección de repeticiones cortas de 1 a 6 pares de bases que se encuentran en tándem en un elevado número de veces en regiones no codificantes del genoma (Ellegren, 2004). Dentro del genoma haploide de *Leishmania* se ha encontrado cerca de 600 (CA)_n repeticiones (Rossi *et al.*, 1994). Los microsatélites permiten realizar estudios de genética, estructura, conservación y manejo de poblaciones de diversos organismos, mediante la detección de polimorfismos co-dominantes simples en los fragmentos de ADN de múltiples genes (Jarne & Lagoda, 1996). Los MLMT se han usado en estudios de estructura genética a nivel intra específico en las especies de *Leishmania*. Esta técnica detectó nuevos genotipos y mostró la coexistencia de grupos genéticos en especies de *Leishmania* del viejo mundo (Schwenkenbecher *et al.*, 2006). Asimismo, se ha usado MLMT para la discriminación de especies dentro de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* las que, se agruparon según el origen geográfico de las cepas (Ochsenreither *et al.*, 2006; Oddone *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 1999). MLMT es una técnica útil para diferenciar especies de *Leishmania* a nivel intraespecífico lo que permite la caracterización de la diversidad de parásitos y establecimiento de vínculos genéticos entre especies semejantes que se encuentran alejadas geográficamente (Schonian *et al.*, 2013).

Los estudios de genética de poblaciones en leishmaniasis cutánea se realizan usualmente utilizando como gold estándar la técnica celular y los cultivos, que facilita la obtención de gran cantidad de material celular de alta pureza, pero tiene la desventaja que los cultivos pueden contaminarse o no crecer en

condiciones de trabajo en campo, además los cultivos consumen tiempo para poder establecerse, requieren personal entrenado, equipos y reactivos de cultivo *in vitro* de células, lo cual restringe su aplicación en los laboratorios especializados en los centros urbanos con mejor disponibilidad de recursos. A partir de estos cultivos se realiza la extracción de ADN para los estudios genéticos. De la misma manera, a nivel mundial, el número de cepas tipificadas procedentes de los criobancos es reducido y adicionalmente estas cepas han sido subcultivadas reiteradas veces con la posibilidad de introducir modificaciones que afecten los estudios de genética poblacional (Schonian *et al.*, 2013). Siendo necesario usar muestras alternativas como biopsias, raspados, hisopados, impresiones, entre otros; que permitan superar las limitaciones que presenta el establecimiento de los cultivos (WHO, 2010). Así, aplicando la técnica de microsatélites, se reportó el uso de aspirados de médula ósea aplicados en papel filtro y en extendidos sobre láminas portaobjeto para estudios de genética de poblaciones usando cepas de *Leishmania donovani*, identificando y diferenciando los genotipos pertenecientes a esta especie (Alam *et al.*, 2009).

Una mayor disponibilidad de muestras procedentes de la mayoría de regiones permitirá comprender los patrones de distribución de la diversidad genética del parásito, esta información servirá para desarrollar herramientas de vigilancia epidemiológica (Boité *et al.*, 2012; Schonian *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se planteó evaluar la calidad y la reproducibilidad en el uso de muestras alternativas como improntas en papel filtro, raspados, biopsias y cultivos de pacientes con leishmaniasis, para determinar la variabilidad genética en poblaciones de *Leishmania (V.) braziliensis*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Género *Leishmania*

Barbara Herwaltd (1999), define a *Leishmania* como: “un protozooario dimórfico de la familia Trypanosomatidae, dentro del género *Leishmania* (orden kinetoplastida), con morfología similar entre las especies del género, pero con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica, causante de una enfermedad conocida como leishmaniosis”. Existen en el mundo cerca de 30 especies que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre.

2.2 Posición taxonómica

Leishmania presenta una morfología similar entre especies lo que complica su clasificación, los criterios iniciales que se utilizaron fueron las características extrínsecas: manifestaciones clínicas, factores geográficos, factores epidemiológicos (Grimaldi & Tesh, 1993). Lainson y Shaw (1978), diferencian a los dos subgéneros, Suprapylaria (*Leishmania*) y Peripylaria (*Viannia*) utilizando el desarrollo del parásito en el tubo digestivo del vector; variables inconsistentes dependientes del estado inmunológico del hospedero humano, las especies del parásito y el comportamiento del vector (Cupolillo *et al.*, 2001).

Desde 1970, se vienen usando criterios intrínsecos para la identificación fenotípica de las especies de *Leishmania*, como técnicas inmunológicas, bioquímicas y genéticas. Las más utilizadas son: el análisis de isoenzimas y los anticuerpos monoclonales (Bañuls *et al.*, 2007). El empleo posterior de técnicas basadas en PCR ha permitido mejorar algunos problemas relacionados con la taxonomía (Schalling & Linda, 2002).

Según: (Cavalier-Smith, 1998) la posición sistemática del género *Leishmania* es la siguiente:

Reino	Protista
Phylum	Euglenozoa
Subphylum	Saccostoma
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Subgénero	<i>Leishmania</i>
	<i>Viannia</i>

Sin embargo, el estudio filogenético utilizando RFLP de la proteína de choque térmico (hsp 70) propone la existencia de ocho especies dentro de los dos subgéneros (*Viannia* y *Leishmania*) (Fraga *et al.*, 2010) como se muestra en el Anexo 1. Donde se presenta a *Leishmania peruviana* como variante o subespecie de *Leishmania braziliensis* al igual que *Leishmania panamensis* como subespecie de *Leishmania guyanensis* lo que estaría llevando a que se ponga en debate la nomenclatura propuesta en la década de los noventa (Schonian *et al.*, 2010).

2.3 Epidemiología de la leishmaniasis en Perú

De acuerdo a las estadísticas del Ministerio de Salud (MINSA), la leishmaniasis se distribuye en el 74% del territorio nacional. Se encuentra concentrada en mayor número en los departamentos de Cusco, Madre de Dios, Cajamarca, Junín, Amazonas y Piura que notificaron más del 50% de casos, desde el 2013 al 2018; siendo los más afectados los varones y la población adulta entre 30 a 59 años de edad (DGE, 2018).

Esta parasitosis no tiene una tendencia definida; la cantidad de casos cutáneos y mucosos en nuestro país, ha sido variable, específicamente, se ha presentado un promedio de 6000 casos anuales los últimos 10 años, con un incremento de casos el año 2011 para luego mantenerse en una constante (ver Tabla 1).

La OMS, en su Informe de Lucha contra la leishmania afirma que: “a pesar de que *leishmania* es una enfermedad de comunicación obligatoria en Perú, el manejo de subregistros imposibilita conocer el número real de enfermos (OMS, 1990).

Tabla 1: Reporte de casos de leishmaniasis a nivel nacional en los departamentos de Madre de Dios, Cusco, Cajamarca, Junín, Amazonas desde el 2009 hasta la semana epidemiológica 52 del 2018

Departamentos	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018*
Madre de Dios	470	406	729	804	1021	698	794	869	816	739
Cusco	985	999	967	951	895	765	633	830	1018	646
Cajamarca	428	597	719	417	385	496	430	645	558	468
Junin	777	702	786	502	485	376	355	489	531	421
Amazonas	275	566	620	378	325	366	323	305	357	392
Casos a nivel nacional	6292	7689	9803	6212	6903	6851	6000	7430	6665	5514

Fuente: Dirección General de Epidemiología-MINSA (DGE, 2018)

2.4 Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo se inicia cuando el insecto vector del género *Lutzomya* (Nuevo Mundo) y *Phlebotomus* (Viejo Mundo) ingiere las formas amastigote del parásito (ver Figura 1) caracterizado por un núcleo, una mitocondria conocida como kinetoplasto y un reservorio flagelar o rizoplasto donde se encuentran los rudimentos del flagelo, los que están adaptados a la temperatura corporal del hospedero y al medio ácido de la vacuola parasitófora del macrófago donde residen y se multiplican por división simple (Neyra, 1997; Lainson & Shaw, 1978).

En los macrófagos, los parásitos se transforman en promastigotes forma móvil y flagelada (ver Figura 2) cuyo flagelo tiene la función de propulsión como para fijarse a las microvellosidades del intestino del mosquito; luego de proseguir con la reproducción asexual por multiplicación binaria, al cabo de unos 8 a 20 días los parásitos migran hacia la cavidad faríngea del insecto bloqueándola y al momento que el insecto intenta tomar sus alimentos, vacía el contenido

de su faringe y de esta manera un promastigote infectado es desplazado e inoculado en el hospedero vertebrado (Ashford, 2000) (Anexo 2).

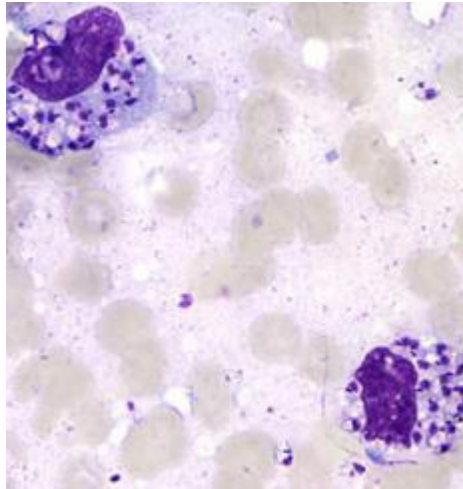


Figura 1: Macrófagos infectados por amastigotes de *Leishmania* spp.
Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

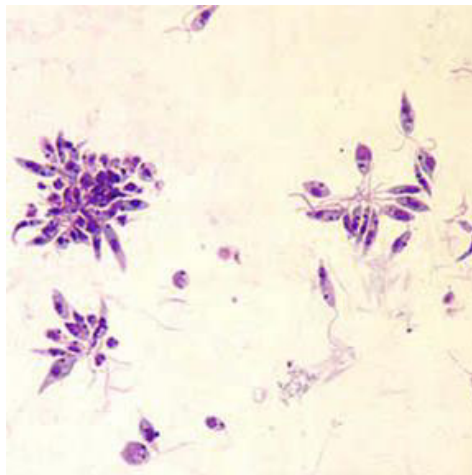


Figura 2: Promastigotes de *Leishmania*, teñidos con colorante Giemsa
Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

2.5 Aspectos clínicos

Se conocen cuatro formas clínicas de la enfermedad, asociándola con 20 especies de *Leishmania*: leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. Los criterios clínicos incluyen los factores del hospedero, estado inmune, entre otros. En el Perú se ha descrito la leishmaniasis cutánea, cutánea difusa y mucocutánea, nos enfocaremos en ellas:

2.5.1 Leishmaniasis cutánea

La aparición de lesiones está asociada a diversas especies del viejo mundo: *L. major*, *L. tropica* y al nuevo mundo como: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*; donde cada especie presenta diferentes patrones epidemiológicos y demográficos (Navin *et al.*, 1992).

La úlcera característica es indolora, con bordes bien definidos, levantados e indurados y cortados en forma de sacabocado, lo que hace que se asemeje a la imagen de un cráter (Goto & Lindoso, 2010) (Figura 3); con un período de incubación variable de semanas o meses (David & Craft, 2009).

En lesiones húmedas estas se cubren de exudado que posteriormente da lugar a una costra (García-Almagro, 2005), cuando se desprende la costra se observa un fondo granuloso de color rojizo, limpio y exudado líquido no purulento (Pearson & Souza, 1996).

La mayoría de lesiones cicatrizan espontáneamente, la cicatriz presenta una despigmentación en el centro y los bordes se mantienen pigmentados, esta cicatriz presenta adelgazamiento de la piel (Reithinger *et al.*, 2007).

La forma cutánea produce múltiples lesiones apartando y excluyendo socialmente a los enfermos, ya que se quedan de forma permanente con cicatrices (WHO, 2010).



Figura 3: Leishmaniasis cutánea: Lesión cutánea ulcerosa donde se observan los bordes levantados, indurados y definidos.

2.5.2 Leishmaniasis cutánea difusa

Lesión caracterizada por la presencia de nódulos, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrucosas. Se inicia bajo la forma de lesiones localizadas y poco a poco se disemina por todo el cuerpo. Estas lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento (Barral *et al.*, 1995).

2.5.3 Leishmaniasis mucocutánea

Forma crónica de la parasitosis y predominante en Sudamérica, las especies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* se han tipificado con esta forma (González, *et.al.*, 2009).

Se inicia en el septum cartilaginoso, presentando exudación, ulceración de mucosa, cartílago, y al destruir la mucosa del otro lado se produce la perforación que puede dar lugar a la destrucción parcial o total del tabique. Las lesiones en la boca comprometen generalmente a los tejidos blandos. (David & Craft, 2009) (Figura 4).

La lesión mucosa no cura espontáneamente llevando a un problema de índole social marginando a los pacientes que la sufren, ya que son víctimas de

discriminación y prejuicio por la falta de conocimiento acerca del contagio de la enfermedad (WHO, 2010).



Figura 4: Leishmaniasis mucocutánea: Se observa la pérdida de la úvula

2.6 Tratamiento de *Leishmania*

No existe un tratamiento eficaz y único para todas las especies de *Leishmania*. La elección de la estrategia de tratamiento se basa en el pronóstico del médico basándose en la anamnesis, epidemiología y especie infectante (Croft & Coombs, 2003).

El tratamiento de la leishmaniasis es un tema difícil de abordar debido a los factores que influyen en la eficacia de los mismos (Tuon *et al.*, 2008).

Los pentavalentes siguen siendo la primera elección para combatir la enfermedad, estos contienen compuestos como: estibogluconato sódico y antimonio de meglumina, estos fármacos presentan la desventaja de ser costosos y causan una amplia variedad de efectos adversos (Navin, *et.al.*, 1992).

2.7 Genoma de *Leishmania*

Las especies de *Leishmania* del nuevo mundo presentan 34 o 35 cromosomas. Los cromosomas son lineales y tienen entre 200 a 4000 Kb de longitud de tamaño variable, presentan telómeros, pero la presencia de centrómeros no ha sido identificada (Lighthall & Giannini, 1992); además, tienen tamaño variable la cual es característica de algunas especies de *Leishmania*, complicando el uso de cariotipos para estudios de taxonomía (Bañuls *et al.*, 2007).

Comparaciones con otros genomas revelan que el orden de genes es altamente conservado entre las especies de *Leishmania* (Ravel, *et.al.*, 1999).

Los tripanosomátidos poseen dos genomas, el ADN nuclear y ADN mitocondrial (ADN del kinetoplasto, ADNk).

El ADN del kinetoplasto constituye del 10 al 30 % del material genético total, es rico en adenina y timina (72-73%) y está formado por numerosas moléculas de ADN circulares concatenadas entre sí como si fuera una red de círculos, que dependiendo de su tamaño recibe el nombre de maxicírculos y minicírculos (Shapiro, 1993) (Anexo 3).

Los maxicírculos son homólogos al ADN mitocondrial en otros eucariotas y en diferentes especies varían en tamaño desde 20 a 40 Kb, estos codifican ARNr y proteínas; dentro de cada maxicírculo se encuentra una región variable no codificante que en *Leishmania tarentolae* es 62Kb. En los minicírculos están los ARN guías (ARNg) que juegan un papel importante en la edición de los ARN mensajeros (ARNm) mitocondriales mediante la inserción y delección de residuos de uridilato en sitios internos del transcripto, estas inserciones pueden llegar a constituir la mitad de la secuencia codificante, debido a la abundante presencia de ediciones, se necesita mayor ARN guía que difieran en su secuencia explicando la alta presencia de estos últimos en la red del kinetoplasto (Bañuls *et al.*, 2007).

2.8 Variabilidad genética de *Leishmania*

Se refiere a la diferencia de la secuencia de material genético entre individuos dentro de una misma especie que puede estar relacionada a eventos como

mutaciones y recombinaciones que le permite sobrevivir a través del tiempo y adaptarse a algún cambio externo (Scitable, 2014). En el caso de *Leishmania* esta variabilidad genética es de interés, ya que se asocia con diversidad de manifestaciones clínicas que están ocasionadas por diferentes especies del parásito (Cupolillo *et al.*,1998); por lo que la clasificación taxonómica de *Leishmania* no está definitivamente cerrada (Schonian *et al.*,2010), lo que indica la gran diversidad dentro del género. Los primeros estudios han señalado que la caracterización se basaba en métodos extrínsecos o de fenotipo y actualmente se utilizan los métodos de caracterización intrínseca las que analizan el genoma del parásito (Cupolillo *et al.*,1998) mediante diversas técnicas.

2.8.1 Técnicas de identificación infraespecíficas

El análisis isoenzimático o *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) es aún considerado el método estándar para la identificación de especies de *Leishmania* y para estudios de diversidad genética (Reithinger *et al.*,2007). El método se basa en la detección de diferentes alelos de genes constitutivos (*housekeeping*) colocando a la movilidad electroforética de enzimas que tienen la misma función, las variaciones se agrupan en zimodemas (presentan el mismo perfil enzimático) pero la desventaja es la necesidad de gran cantidad de cultivo, el tiempo y el costo (Bañuls *et al.*,2007).

2.8.2 Técnicas de identificación genotípicas

Son técnicas basadas en el análisis del genoma entre estas se tienen:

2.8.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variantes.

Desarrollada por Kary Mullis *et al.*, (1986), esta técnica permite generar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con el fin de detectar una secuencia de interés; esta amplificación se da a partir de secuencias de nucleótidos “cebadores” que reconocen una secuencia blanco del cual son complementarias. A partir de esta metodología, la FAO revela que se desarrollaron los marcadores RFLP (polimorfismos de restricción de la longitud de los fragmentos), RAPD (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos), microsatélites, minisatélites entre otros (FAO, 2010).

2.8.2.2 PCR-RFLP.

Detecta pequeñas variaciones en un fragmento de ADN amplificado (producto de PCR) mediante la digestión posterior con diferentes enzimas de restricción, que reconocerán o no el sitio de corte dependiendo de las variaciones en la secuencia de nucleótidos. El patrón de bandas de los productos digeridos que se visualiza tras la electroforesis es distinto para cada individuo y es útil para distinguir especies del subgénero *Viannia*. Uno de los genes más utilizados en la caracterización y filogenia de *Leishmania* es el gen de la glucoproteína de membrana de 63kDa, denominada gp63 (Victoir *et al.*, 1998). Por otro lado, la PCR-RFLP de los minicírculos de ADNk ha permitido la detección de *L. (L.) tropica* en estudios epidemiológicos (Noyes *et al.*, 1998).

2.8.2.3 Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD)

Esta técnica de PCR utiliza un único cebador o *primer* de secuencia arbitraria y de corta longitud (10 bases). Es un método simple que no necesita conocer previamente las secuencias de ADN. Los cebadores se unen a sus secuencias complementarias generando productos de amplificación de diferentes tamaños cuya identidad se desconoce. La técnica identifica polimorfismos que son detectados como fragmentos de ADN amplificados y que están presentes en una cepa (Williams *et al.*, 1990).

Normalmente los cebadores de pequeño tamaño son probados individualmente y aquellos que presentan patrones de bandas reproducibles son usados en estudios genéticos. Usando esta técnica la variación genética ha sido descrita para muchos parásitos y usada de manera extensa para estudios de estructura de poblaciones (Tibayrenc *et al.*, 1993). También, es utilizada en la diferenciación de especies de *Leishmania* (Cuervo *et al.*, 2004).

2.8.2.4 Microsatellites

Son elementos polimórficos cortos, repetidos en tándem de 1- 6 pares de bases, que se encuentran de manera abundante y aleatoria en el genoma eucariótico lo que permite estimar la diversidad genética en una población (Tóth *et al.*, 2000).

El análisis de microsatélites permite diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos (utiliza marcadores codominantes) usa pequeñas cantidades de ADN (10-100ng por reacción) y su reproducibilidad es alta. Además, su especificidad es de un locus por lo que pueden ser usados en reacciones de PCR multiplex (Spooner *et al.*, 2005).

Los microsatélites han sido usados como herramientas de tipificación, utiliza 3 loci para tipificar todas las especies del subgénero (*Viannia*) excepto *L. naiffi*.

Para determinar la importancia epidemiológica abordando la diversidad genética de las diferentes especies de *Leishmania*, se han utilizado mayormente segmentos microsatélites de regiones neutrales (no presentan alto grado de mutación) (Rougeron *et al.*, 2008); en cepas de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* aisladas de pacientes mediante cultivo *in vitro*. Dichos estudios han mostrado un alto nivel de homocigosidad con presencia de desequilibrio genético (Rougeron *et al.*, 2011), lo que no concuerda con el modelo de reproducción clonal descrito para *Leishmania* (Tibayrenc & Ayala, 2002). Así mismo, otros estudios indican la existencia de diferencias genéticas en relación con la distribución geográfica, así como también, una fuerte estructuración poblacional en escala microgeográfica (Rougeron *et al.*, 2009).

Por otro lado, se han desarrollado estudios de genotipos en pacientes fenotipificados por MLEE y genotipificados por MLMT en Huánuco, zona endémica para la leishmaniasis, descrita previamente con presencia de híbridos (*L. (V.) braziliensis/peruviana*) en los cuales encontraron una desviación parcial en el equilibrio Hardy-Weimberg y un enlace de desequilibrio (linkage disequilibrium) significativo que demostró que hubo alguna forma de intercambio genético (Nolder *et al.*, 2007).

A nivel de especies en el viejo mundo se han desarrollado marcadores microsatélites basados en secuencias nucleotídicas de *L. (L.) major* y aplicando modelos bayesianos se encontraron 3 poblaciones principales (Asia Central, Medio Este y África) con 2 subpoblaciones, hallando frecuente intercambio genético relacionando ese intercambio con la presencia de

roedores y su amplia distribución como hospederos de la enfermedad (Al-Jawabreh *et al.*, 2008).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las muestras clínicas como biopsia, impresión en papel filtro y raspado por lanceta de pacientes con leishmaniasis cutánea producida por *L. (V.) braziliensis*, son útiles para determinar la variabilidad genética

OBJETIVOS

Objetivo General:

Establecer la utilidad de las muestras clínicas alternativas a los cultivos, para determinar la variabilidad genética en poblaciones de *L. (V.) braziliensis* aisladas de pacientes del Perú.

Objetivos Específicos:

- Comparar la frecuencia de amplificación por PCR de fragmentos microsatélites en cultivos versus otras muestras clínicas como biopsias, improntas y raspados obtenidos de lesiones cutáneas.
- Establecer si, los fragmentos microsatélites son similares utilizando cultivos versus otras muestras clínicas como biopsias, improntas y raspados.
- Determinar la variabilidad genética y la estructura poblacional de los cultivos, biopsias, improntas y raspados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño de Estudio

El presente estudio fue de corte transversal, de este modo se realizó la evaluación de muestras colectadas entre los meses de enero a octubre del 2014. Como parte del protocolo NMRCD.2007.0018.

4.2 Declaración ética

La presente investigación se realizó en el Departamento de Parasitología del “*Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU 6)*” Al momento de su participación, los pacientes proporcionaron consentimiento informado para el uso de sus muestras y se completó una ficha clínico epidemiológica por paciente.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de NAMRU-6 cumpliendo las regulaciones federales que regulan la protección de sujetos humanos.

4.3 Lugares de colecta de las muestras

Las muestras se colectaron en Lima en el Hospital Militar Central (HMC), en Iquitos, Hospital de Apoyo de Iquitos (HAI) y en Madre de Dios, Hospital Santa Rosa, el Laboratorio Referencial y los Centros de Salud Nuevo Milenio y Jorge Chávez de Puerto Maldonado, donde se desarrollaron diferentes estrategias para la toma de muestras de pacientes como parte del apoyo diagnóstico para los Centros de Salud.

Entre el 2011 y 2014 se enrolaron 42 pacientes con leishmaniasis cutánea, procedentes de los Departamentos de Loreto, Madre de Dios, Cusco, Ucayali y Junín (Tabla 2 y Figura 5). De dichos pacientes se aislaron 120 muestras clínicas (42 cultivos, 21 biopsias, 30 impresiones en papel filtro y 27 raspados mediante lanceta). Todas las muestras fueron identificadas previamente dentro del género *Leishmania* mediante PCR del ADN del kinetoplasto (ADNk-PCR) (López *et al.*, 1993) y caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* mediante PCR anidado en tiempo real (nested RT-PCR) según procedimientos ya descritos (Tsukayama *et al.*, 2013).

Tabla 2: Listado de muestras biológicas según procedencia y tipo de muestra clínica obtenida

Código	Departamento	Tipo de muestra tomada			
		Cultivo	Biopsia	Papel Filtro	Lanceta
LDP 0005	Ucayali	x	x		
LDP 0011	Cusco	x	x		
LDP 0012	Junín	x	x		
LDP 0013	Junín	x	x		
LDP 0019	Junín	x	x		
LDP 0020	Junín	x	x		
LDP 0021	Junín	x	x		
LDP 0022	Junín	x	x		
LDP 0025	Junín	x	x		
LDP 0026	Junín	x	x		
LDP 0027	Junín	x	x		
LDP 0034	Madre de Dios	x	x		
LDP 0044	Madre de Dios	x	x	x	
LDP 0046	Junín	x	x	x	
LDP 0049	Junín	x	x	x	
LDP 0053	Cusco	x	x	x	x
LDP 0057	Loreto	x	x	x	x
LDP 0060	Junín	x	x	x	x
LDP 0065	Junín	x	x	x	x
LDP 0066	Junín	x	x	x	x
LDP 0067	Cusco	x	x	x	x
LDP 1012	Loreto	x		x	
LDP 1023	Loreto	x	x	x	x

Código	Departamento	Tipo de muestra tomada			
		Cultivo	Biopsia	Papel Filtro	Lanceta
LDP 2036	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2039	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2041	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2045	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2053	Madre de Dios	x			x
LDP 2059	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2065	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2074	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2084	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2085	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2089	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2090	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2094	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2095	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2096	Madre de Dios	x		x	x
LDP 2098	Cusco	x		x	x
LDP 2099	Madre de Dios	x		x	x
LDP 4048	Madre de Dios	x		x	x
MIS 1911	Madre de Dios	x		x	x

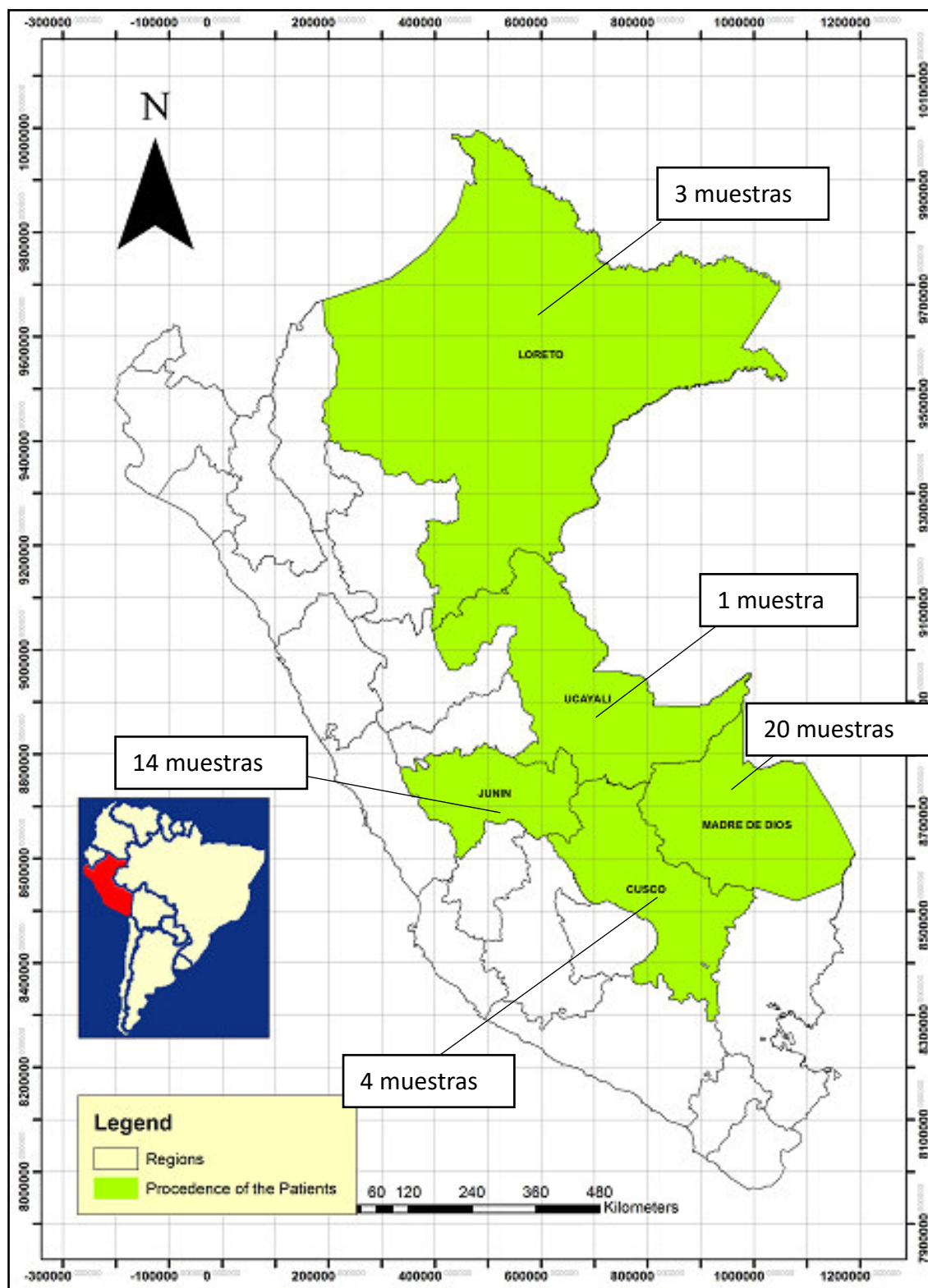


Figura 5: Departamentos de procedencia de las muestras de estudio

El control positivo para todos los análisis fue la cepa (MHOM/BR/84/LTB300) originaria de Brasil, mientras que las 120 muestras clínicas peruanas proceden de Ucayali, Cuzco, Junín, Loreto y Madre de Dios (MDD).

4.4 Toma de muestra, almacenamiento y transporte

Aspirado para cultivo. El aspirado de la lesión se realizó con una jeringa de 3 cc con 0,1ml de solución salina estéril al 0.85% más gentamicina al 1% (10 mg/ml) y 1% de 5-fluorocitosina (5 mg/ml). Se introdujo la jeringa en el borde interno engrosado de la lesión y se aspiró el fluido linfático mediante la rotación de la jeringa evitando el sangrado excesivo de la lesión. El fluido obtenido se colocó en tubos de cultivo Delta Nuncclon conteniendo el medio agar sangre de Senekjie (Anexo 4-c) enriquecido con 20% de sangre desfibrinada de conejo más gentamicina (10 mg/ml). Este medio permitió el aislamiento primario del parásito.

Raspado con lanceta. Se raspó el borde interno de la lesión activa con el extremo romo de una lanceta estéril. El tejido obtenido se colocó en un tubo de 1.5 ml conteniendo 1 ml de etanol al 100% el cual se almacenó a temperatura ambiente hasta el momento de la extracción del ADN.

Impronta en papel filtro. Se colocó papel filtro cuantitativo Q8 (Fisher Brand) sobre la lesión por 1 minuto, luego se secó el papel filtro a temperatura ambiente y finalmente se colocó en etanol al 100% según Boggild *et al.*, (2010). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento de la extracción del ADN.

Biopsia de la lesión. Como anestésico local se aplicó lidocaína al 2% por vía subcutánea en la zona de la lesión, luego se insertó un sacabocado de 3 mm de diámetro y se efectuó movimientos rotatorios para cortar la dermis. El tejido se aisló con ayuda de un bisturí y una aguja La muestra se almacenó en etanol al 100% a temperatura ambiente hasta el momento de la extracción de ADN.

4.5 Cultivo y crecimiento en masa de parásitos

Mediante el microscopio invertido Tissue Culture Microscope marca AO Scientific Instrument-BioStar modelo 1820, cada semana y durante un mes se observó el crecimiento celular y la motilidad de los parásitos. Cuando estos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial se tomó una alícuota de la cepa para establecer un crecimiento masivo del parásito y se hizo una réplica en dos frascos de 25 cm² con cinco mililitros de solución Schneider (Anexo 4-b). Los frascos fueron destinados para extracción de ADN y para la criopreservación (congelación) de la cepa en solución Schneider más 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en nitrógeno líquido.

4.6 Extracción de ADN de las muestras

El ADN de los parásitos se extrajo utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

- **Obtención de ADN a partir de cultivo.** Los parásitos en crecimiento exponencial en solución Schneider fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 200 µl de PBS 1X, al cual se le añadieron 180 µl de buffer comercial del kit llamado ATL con 20 µl de proteinasa K (Qiagen). Las muestras se incubaron a 56 °C por una hora, luego se adicionaron 200 µl de etanol absoluto y la mezcla se colocó en una columna de adsorción de ADN (DNeasy Mini spin column).
- **Obtención de ADN a partir de raspados.** El tejido adherido en la lanceta se separó con una aguja estéril y se reservó en etanol absoluto. La muestra se centrifugó a 14000 rpm por cinco minutos, se descartó el etanol y se dejó secar el sedimento, al cual se agregaron 180 µl de buffer comercial del kit llamado ATL más 20 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer AL. La solución se mezcló por inversión y se incubó por una hora a 56° C. Luego se añadieron 200 µl de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se colocó en una columna de adsorción de ADN (DNeasy Mini spin column).

- **Obtención de ADN a partir de impronta en papel filtro.** El papel filtro se extrajo del etanol y se dejó secar sobre un porta objetos, para posteriormente cortarlo en tiras de 3 x 2 mm. Estas tiras se colocaron en 180 µl de buffer comercial del kit llamado ATL y se incubaron a 85° C por 10 minutos. Luego se agregaron 20 µl de proteinasa K y se incubó a 56° C por una hora. Posteriormente se añadieron 200 µl de buffer AL y se incubó a 70° C por 10 minutos. Finalmente se añadieron 200 µl de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Esta mezcla se colocó en una columna de adsorción de ADN (DNeasy Mini spin column).

- **Obtención de ADN a partir de biopsia.** Se retiró el tejido preservado en etanol con ayuda de una aguja estéril y se colocó en la solución buffer PBS 1X que permitió lavar y eliminar trazas de etanol de la biopsia, que podrían interferir con los pasos posteriores de extracción de ADN. La biopsia se colocó sobre un portaobjetos con 20 µl de PBS 1X y se trituró con una cuchilla de aluminio (Personna Ltd). En un tubo limpio se colocaron 180 µl de buffer comercial del kit ATL y 20 µl de proteinasa K, a esta mezcla se adicionó la muestra triturada y se incubó a 56°C toda la noche. Al día siguiente se añadieron 200 µl de buffer comercial del kit AL, se mezcló por inversión y se incubó a 70° C por 10 minutos. Luego se adicionaron 200 µl de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Esta mezcla se colocó en una columna de adsorción de ADN (DNeasy Mini spin column).

Para todos los casos, las columnas de adsorción de ADN de las muestras de cultivo, raspado, papel filtro y biopsia se centrifugaron a 8100 rpm por dos minutos. Luego se agregaron 500 µl de buffer de lavado comercial del kit AW1 y se centrifugó a 8100 rpm por 2 minutos. Se eliminó el tubo de colecta con el primer lavado y el filtro se colocó en un nuevo tubo de colecta. Posteriormente, se añadieron 500 µl de buffer comercial del kit AW2 a la columna y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se eliminó el tubo de colecta con el segundo lavado y el filtro se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 100 µl de buffer de elución. Después se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos y luego se centrifugó la columna a 8100 rpm por 2 minutos.

Todas las muestras se reservaron a -20° C hasta el momento de su uso.

4.7 Determinación de la concentración de ADN total

La concentración del ADN total se estimó midiendo la absorbancia de la luz ultravioleta en una relación 260/280 nm, en el equipo Nanodrop 1000 (ThermoScientific) un espectrofotómetro cuya característica es además de proveer la concentración de ADN en ng/μl, indicar la calidad y pureza de la muestra obtenida mediante la relación A260/A280 (Sambrook, 1989).

4.8 PCR de los marcadores microsatélites

- Controles utilizados

Para el análisis de los fragmentos microsatélites se usó agua grado molecular como control de ausencia de contaminación de la reacción, ADN humano de una persona sin leishmaniasis como control negativo y ADN de la cepa: MHOM/BRA/84/LTB300 de *L. (V.) braziliensis* como control positivo.

- Amplificación de los marcadores microsatélites

Se utilizaron nueve pares de cebadores o *primers* previamente reportados para *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* (Rougeron *et al.*, 2008; 2009). Los cebadores “forward” para ser detectados en la electroforesis capilar, fueron marcados (labeled forward) con compuestos fluorocromos cuya función es emitir una longitud de onda determinada; se utilizaron 3 tipos de fluorocromos NED, HEX y FAM tal como se muestra en la Tabla 3.

La mezcla maestra de la PCR tuvo un volumen de 10 μl las que contenían los siguientes componentes a concentración final: buffer de PCR 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0.2 mM, cebadores *labeled forward* y *reverse* a 5 pmol cada uno y *Platinum* ADN Taq polimerasa 1U/μl. A esta mezcla se añadieron 2 μl de ADN.

Tabla 3: Cebadores utilizados para el análisis de microsatélites

Nombre	Tipo de repetición	Secuencia
AC52	(CA) ₁₈ TA (CA) ₁₄	5' CATCTACGGCTGATGCAGAA 3' NED 5' ATTCCCACTTTAGCCAGACG 3'
LRC	(GT) ₁₇	5' CTGCCTCTGCCTCACCTACT 3' HEX 5' GATGGGGAGTGTGAGGGTTAG 3'
EMI	(GT) ₁₉	5' CGCTGAAGCACGGCGAATG 3' NED 5' GAACGGACAGAGGAGCTACG 3'
G09	(CA) ₃ (GA) ₁₂	5' CAAGCAGGCAAGAGTCTGAAA 3' FAM 5' TAGAGAGCAATACGGGAGAC 3'
E11	(GA) ₁₀	5' TGCCTAGGGCAAAGGAGTT 3' FAM 5' GAATGCAGGCAGACACCC 3'
ARP	(GT) ₁₀	5' GGCTTCGGTCTGTTCGACTA 3' NED 5' TACGGATGCGAGTGGGTG 3'
CAK	(GA) ₁₅	5' TGGAAGAAGGCAGTGGTACA 3' FAM 5' GGAAAAAGGTGTCCTCTCCA 3'
LBA	(GA) ₁₁	5' CCTCTGTGAGAAGGCAAGGA 3' HEX 5' ACGAGAGAATGCATGTGCAGC 3'
Ibh3	(GT) ₂ GG (GT) ₂ GG(GT) ₄	5' GGAGAGGCTGCGATGTATCT 3' HEX 5' CTTCTGCAAGACAGCCCTG 3'

Fuente: (Rougeron, et.al., 2008; 2009).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *GenAmp 9700* PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación de cebadores a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por un minuto, con una extensión final de 72° C por 5 minutos.

4.9 Electroforesis en capilar

Para observar los productos de las PCR se realizó una electroforesis en capilar usando el analizador de fragmentos Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems), que permitió separar e identificar los alelos de los nueve marcadores utilizados a manera de electroforegramas. Se tomó un microlitro de los productos de la PCR y se mezcló con 8.75 µl de formamida HiDi (AB) y 0.25 µl del marcador de peso molecular estándar ROX 350. La mezcla fue desnaturalizada a 95° C por 3 minutos e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la renaturalización de la doble hebra del ADN. Las muestras se colocaron

en el analizador y se realizó la electroforesis durante 50 minutos a 15kV en un capilar de 50 centímetros usando el polímero POP7.

Para facilitar la evaluación de los productos de amplificación de PCR, se realizó un pseudomultiplexing o poolplexing (Ghislain *et al.*, 2004) que permitió agrupar los marcadores en tres paneles, grupos A, B y C según los fluoróculos de cada primer y el rango de amplificación teórica esperada en pares de base (Tabla 4).

Tabla 4: Agrupamiento de marcadores microsatélites

Grupo A	Fluoróculo	Rango (bp)	Grupo B	Fluoróculo	Rango (bp)	Grupo C	Fluoróculo	Rango (bp)
AC 52	NED	84-108	E11	FAM	96-104	LRC	HEX	114-138
ARP	NED	128-165	Ibh3	HEX	128-131	G09	FAM	148-168
LBA	HEX	166-188	CAK	FAM	158-165	EMI	NED	165-193

4.10 Análisis de microsatélites

Los electroferogramas se analizaron mediante el software GeneMapper Software Version 4.0 (AB) para establecer los *bins* de cada marcador. Un *bin* es la posición asumida en bp de un alelo de tamaño conocido dentro de un marcador. Se excluyeron picos menores a 200 unidades arbitrarias de fluorescencia, además de picos repetidos (*stutters*).

El marcador de peso molecular GeneScan™-350 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) permitió distinguir en los electroferogramas la ubicación de los picos de fluorescencia de cada marcador microsatélite. El rango del marcador fue de 35 a 350 bp y cada fragmento estuvo marcado con el fluoróculo ROX™ (Figura 6). El tamaño de los alelos identificados fue registrado en números enteros y también se documentó la ausencia de amplificación.

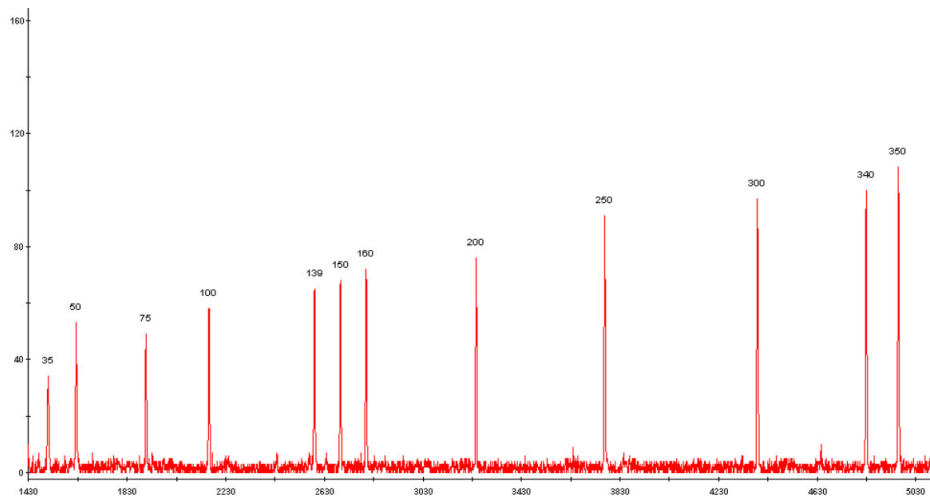


Figura 6: Electroferograma del marcador de peso molecular GeneScan™-350 ROX™. El eje X señala la posición en pares de base de los alelos y el eje Y la intensidad medida en unidades arbitrarias de fluorescencia, rfu. Fuente: Thermo-Scientific Inc, 2014.

4.11 Análisis de datos

Utilidad de las diferentes muestras clínicas.

A partir de los datos recopilados del software GeneMapper v 4.0, se procedió a construir una base de datos que fue procesada con el soporte del paquete estadístico SPSS 22.0.

Para analizar los datos se procedió inicialmente con un análisis descriptivo calculando e interpretando estadísticos como porcentajes, medias y desviación estándar que muestren el comportamiento de las frecuencias de amplificación por PCR de los nueve fragmentos microsatélites, a partir de las muestras clínicas que se tomaron como referencia (usando cultivo celular) y su comparación con las muestras clínicas alternativas (biopsias, improntas en papel filtro y raspados con lancetas) tanto de forma individual como combinada

Así mismo, se describió el comportamiento de las frecuencias de amplificación por PCR de los dos alelos para cada uno de los nueve fragmentos microsatélites tanto de las muestras clínicas de referencia como de las alternativas y para ello se consideró importante el uso de gráficos de los errores estándar al 95% de confianza que complementen los estadísticos descriptivos para una adecuada interpretación de los resultados.

Finalmente, se realizó un análisis inferencial (concluyente) que comparó los resultados con las variables dependientes: frecuencias de amplificación por PCR de los nueve fragmentos microsatélites. La comparación de los resultados se realizó mediante la prueba de Análisis de varianza univariante (ANOVA) y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Duncan. Estas pruebas se realizaron para cada fragmento microsatélite. Las dos pruebas fueron sometidas a un nivel de significancia del 5%.

De la misma forma se realizó la representación gráfica de intervalo de confianza para las medias al 95% para observar si existe similitud con el valor promedio de la muestra de referencia y observar si existe uniformidad (homogeneidad) entre las frecuencias de amplificación.

Determinación de la diversidad genética

El polimorfismo genético se determinó mediante tres índices de variabilidad calculados con el software Cervus v3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Primero, el número promedio de alelos (N_A) que define el número de los alelos observados en un locus (marcador) dentro de una población, pero influenciado por el tamaño de la muestra.

Segundo, la heterocigosidad observada (H_O), es el número de heterocigotos para un locus dividido entre el número total de individuos muestreados de una población.

Tercero la heterocigosidad esperada (H_E) que es la proporción de individuos que se espera sean heterocigotos según las condiciones del equilibrio de Hardy Weinberg. La diversidad genética es máxima cuando $H_E = 1$ y es mínima cuando $H_E = 0$.

Así mismo, se calculó el grado de información proporcionado por cada marcador microsatélite, mediante el contenido de información polimórfica (PIC). Los valores superiores a 0,5 se consideran muy informativos, los valores entre 0,25 y 0,5 son medianamente informativos y los valores inferiores a 0,25 poco informativos (Botstein *et al.*, 1980).

Se aplicó la correlación de Pearson para evaluar si los cultivos producían índices similares de H_E y PIC comparados con los otros tipos de muestras clínicas utilizadas (biopsia, impronta y raspado).

Determinación de la estructura poblacional

La medición de la estructura poblacional se realizó utilizando el software STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) el cual usa un algoritmo bayesiano que predice un número K de grupos o *clusters* existentes en una determinada población. Se asumieron valores de K de uno a seis según el lugar geográfico de procedencia de las muestras y se usaron 10000 períodos de prueba (*Burn-in*) con 100000 réplicas. Se determinó el número de grupos como el correspondiente al valor que maximice la derivada del número de posibles poblaciones, ΔK . La estructura de la población fue determinada asignando los individuos a un grupo o *cluster* mediante un análisis de membresía basado en un algoritmo bayesiano. Las representaciones gráficas de los resultados del programa Structure se editaron con el programa Distruct 1.1 (Rosemberg, 2003).

También, se realizó un análisis de correspondencia la cual es equivalente al análisis de componentes principales utilizando variables cualitativas como son zonas geográficas. El objeto del análisis de correspondencias es mostrar de forma gráfica la ubicación, posición de las características estudiadas que refleje algún grado de asociación entre ellas (Llopis, 2017), se usó como estrategia agrupar según regiones geográficas debido a los resultados obtenidos de los análisis de membresía resultantes del software STRUCTURE v2.1; si existe relación entre las muestras estas se tenderán a agrupar, en el caso de las muestras según origen geográfico en regiones de selva alta y selva baja.

Cálculo de la distancia genética

Se estimó la distancia genética entre todas las cepas de *L. (V.) braziliensis* mediante la distancia genética de Nei (Nei, 1972). Con este cálculo se construyó un dendograma basado en el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) utilizando el software Populations v1.2.32 con 1000 repeticiones (Langella,

1999). Para visualizar y editar el árbol previamente generado se usó el software Megapluus v6 (Tamura *et al.*, 2007).

V. RESULTADOS

Luego de realizar el análisis de los datos referidos a los fragmentos microsatélites, para cada muestra clínica: cultivo, biopsia, impronta en papel filtro y raspado con lanceta se encontró para las muestras procedentes de Brasil (control positivo), Ucayali, Cusco, Junín, Loreto y Madre de Dios lo siguiente:

5.1 Identificación de fragmentos mediante electroforesis capilar

Para la determinación de los productos de amplificación se agruparon los marcadores en número de tres, comparándolos con un estándar de amplificación conocida. Una vez resueltos los productos de amplificación mediante la electroforesis capilar, se procedió a determinar los alelos para cada muestra, se estableció los alelos que se fueron amplificando y se registró en números enteros en una base de datos. Para establecer los alelos de cada marcador y muestra se tomó en consideración el rango teórico de amplificación y la emisión de los fluorocromos que debieron ser mayores a 200 unidades relativas de fluorescencia. Se observó las amplificaciones por panel y cuando hubo alguna incongruencia se repitieron las corridas y se consideró el alelo más frecuente, comparando con los resultados previos de las muestras clínicas del mismo.

La agrupación teórica fue respaldada con los electroforegramas obtenidos ya que los alelos de las muestras no se solaparon y los fluoró cromos ayudaron en la identificación y discriminación de cada alelo. Las diferencias en la intensidad de los picos estuvo mas relacionada a la cantidad y calidad del ADN utilizado. A continuación, se presentan algunos electroforegramas que indican la amplificación de las muestras agrupadas en tres paneles A, B y C, y se observa los alelos que se presentan (Figuras 7, 8 y 9).

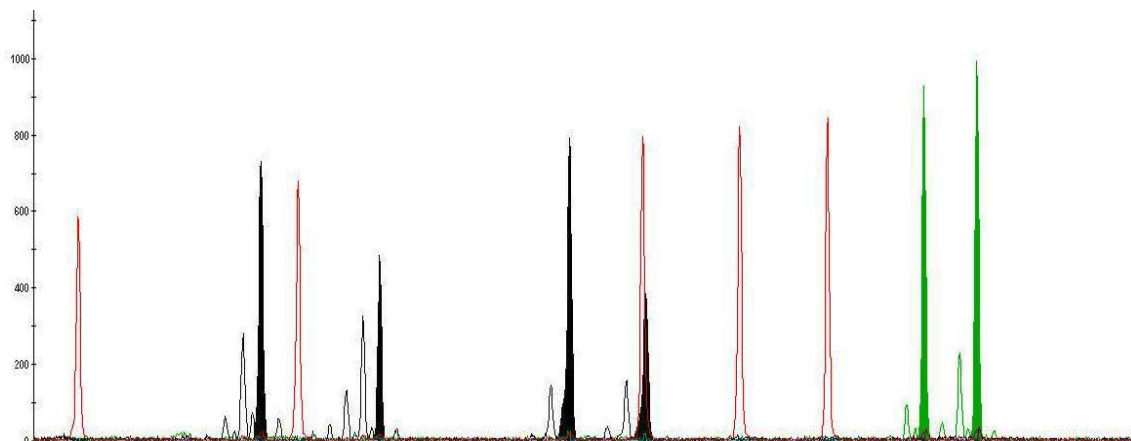


Figura 7: Electroforegrama de una muestra usando el Panel A. Formado por los marcadores AC52, ARP y LBA, los primeros marcados con fluorocromo NED y el último con HEX, la coloración sólida indica los alelos encontrados, hacia el lado izquierdo se presenta uniones inespecíficas a manera de ruido, siendo el pico de color rojo el estándar utilizado.

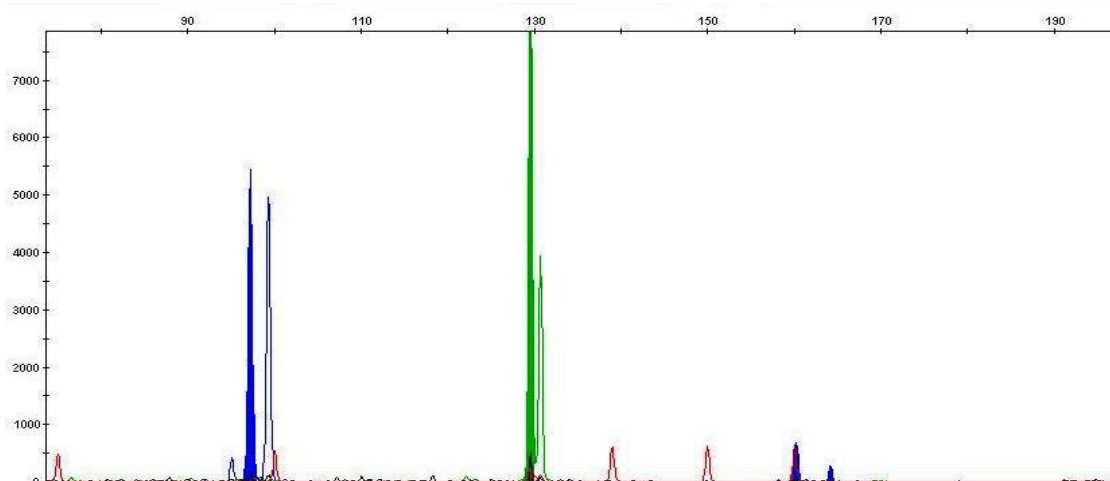


Figura 8: Electroforegrama de una muestra usando el Panel B. Formado por los marcadores E11, lbh3 y CAK, el primer y el último cebador están marcados con el fluorocromo FAM (color azul), el cebador lbh3 tiene el fluorocromo HEX, la coloración sólida indica los alelos encontrados, el pico de color rojo indica el estándar usado.

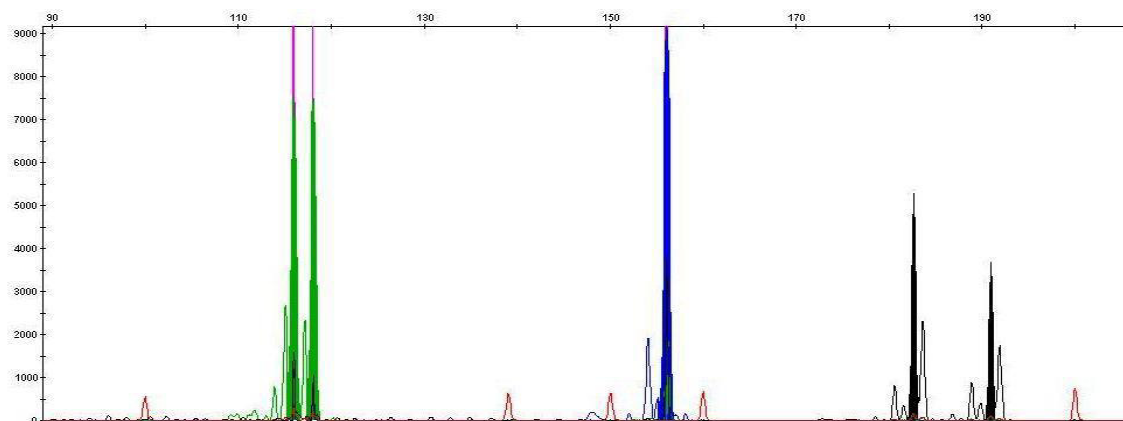


Figura 9: Electroforegrama de una muestra usando el Panel C. Formado por los marcadores LRC, G09 y EMI marcados con fluoróforos HEX, FAM y NED. Nótese las líneas verticales fucsias sobre el electroforegrama del marcador LRC en verde, estos indican una cantidad muy elevada de material genético.

Con el objetivo de ejecutar el análisis de diversidad genética se construyó una matriz de datos, escribiendo en números enteros los alelos identificados por el software GeneMapper v4.0, para realizar los análisis descriptivos acerca de la amplificación de los alelos.

5.2 Porcentaje de amplificación de los fragmentos satélites clasificados según alelos (1 y 2), lugar de procedencia de las muestras y tipo de muestras clínicas.

Realizando un análisis descriptivo, en la Tabla 5, se observa en forma global el porcentaje de amplificación encontrado por alelo para cada uno de los nueve marcadores microsatélites usados en las 120 muestras clínicas.

Se demostró el porcentaje de amplificación del alelo 1 para todas las muestras clínicas siendo eficaz frente a la comparación con el alelo 2. Al realizar un análisis global de ambos alelos con todos los marcadores y mostrar su eficiencia se tiene: el porcentaje promedio de amplificación de ambos alelos es de 79.1% en cultivos, seguido por una eficiencia promedio de ambos alelos en el raspado con 62.3%, para luego presentar una amplificación promedio de ambos alelos de 59.2% en improntas con papel filtro y 54.9% utilizando biopsias. Se debe resaltar que algunos marcadores como: **AC52, ARP, LBA, CAK, LRC y EMI** presentaron una eficacia promedio para ambos alelos de 83.8% para cultivo, seguido por el raspado 74.2%, improntas con papel filtro 68.8% y 66.6% en biopsias, apoyando el análisis global descrito anteriormente. Los marcadores que presentaron

ineficacia en la amplificación fueron los marcadores **E11**, **IBH3** y **G09**, así se tiene que para los cultivos la amplificación promedio de ambos alelos fue del 69.3%, seguidas por las improntas en papel filtro con 40.0%, raspado 38.6% y finalmente las biopsias con una amplificación promedio de ambos alelos de 31.3%

Por otro lado, cuando se analiza la eficacia por marcador para ambos alelos sin diferenciar muestras usadas, se observa de forma general que el marcador **ARP** es más eficiente con una amplificación promedio 85.1%, seguido del marcador **LBA** con 74.9%, **EMI** 74%, **LRC** 72.6%, **CAK** 67.3%, **AC52** 66.5%. Finalmente, los marcadores **IBH3**, **E11** y **G09** presentaron una eficiencia de amplificación del 48.6%, 44.0% y 41.9% respectivamente.

Tabla 5: Porcentaje Global de amplificación según muestra clínica y marcadores

Tipo Muestra Clínica	Alelo	Porcentaje de Amplificación de los nueve fragmentos microsatélites (marcadores)								
		AC52	ARP	LBA	E11	IBH3	CAK	LRC	G09	EMI
Cultivo	1	100%	100%	100%	93%	96%	93%	94%	98%	93%
	2	64%	87%	62%	51%	25%	76%	77%	53%	60%
Biopsia	1	68%	82%	82%	46%	91%	77%	64%	14%	82%
	2	46%	86%	64%	23%	5%	41%	50%	9%	59%
Impronta	1	60%	67%	80%	53%	50%	70%	80%	47%	80%
	2	53%	73%	70%	23%	30%	63%	60%	37%	70%
Raspado	1	74%	93%	74%	41%	59%	59%	89%	44%	78%
	2	67%	93%	67%	22%	33%	59%	67%	33%	70%

En la Tabla 6 y figura 10, se aprecia la disgregación del porcentaje global de amplificación; con la variable de lugar de procedencia. Según el origen de procedencia las muestras que presentaron una eficacia en la amplificación fueron las muestras de Ucayali con un porcentaje promedio de amplificación de 81.93%, seguido de las muestras de Cusco 72.5%, luego muestras de Madre de Dios 70.65%, Loreto 66.65% y finalmente las muestras de Junín 57.9%.

Disgregando la Tabla 6, se realiza un análisis según tipo de muestra y origen geográfico, se presenta las muestras procedentes de Cusco con un porcentaje de amplificación promedio por marcador y por alelo, en cultivos 79.2%, seguido por los raspados 74.1%, improntas 72.2% y finalmente las biopsias 64.7%. En

las muestras procedentes de Junín se presenta la amplificación promedio de 72.7% para cultivos, seguido de los raspados con un 63.8%, biopsias 48.6% e improntas 46.6%. Las muestras procedentes de Loreto presentaron amplificación promedio de 69.4% para las biopsias, cultivos 67.6%, improntas 65.8% y raspados 63.8%. Las muestras procedentes de Madre de Dios, con un promedio de 90% para cultivos, biopsias 75%, improntas 60.4% y raspados 57.2%. Por último, las muestras procedentes de Ucayali tuvieron una amplificación promedio del 100% en improntas y raspados, seguidos por los cultivos 72.2% y finalmente las biopsias con 55.5%.

Tabla 6: Porcentaje de Amplificación de los nueve fragmentos microsatélites según origen geográfico

Origen	N° muestras	Tipo Muestra Clínica	Alelo	Porcentaje de Amplificación								
				AC5	ARP	LBA	E11	IBH	CAK	LRC	G09	EMI
Brasil	10	Cultivo	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			2	40%	80%	0%	40%	0%	100%	100%	0%	0%
Cusco	4	Cultivo	1	100%	100%	100%	100%	100%	75%	100%	100%	75%
			2	75%	100%	75%	25%	25%	25%	100%	50%	100%
		Biopsia	1	33%	100%	100%	100%	100%	100%	67%	33%	100%
			2	33%	100%	100%	0%	0%	0%	67%	33%	100%
		Impronta	1	67%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	67%	100%
			2	67%	100%	67%	0%	33%	33%	33%	33%	100%
		Raspado	1	67%	100%	100%	100%	100%	67%	100%	67%	100%
			2	67%	100%	67%	33%	33%	33%	67%	33%	100%
Junin	14	Cultivo	1	100%	100%	100%	93%	93%	93%	100%	93%	86%
			2	57%	96%	50%	43%	0%	71%	50%	21%	64%
		Biopsia	1	86%	86%	71%	29%	86%	64%	50%	7%	71%
			2	50%	89%	50%	14%	0%	36%	29%	0%	57%
		Impronta	1	60%	60%	60%	40%	60%	60%	40%	60%	60%
			2	40%	80%	60%	20%	0%	40%	40%	0%	60%
		Raspado	1	100%	83%	67%	33%	100%	67%	67%	33%	100%
			2	33%	100%	100%	33%	0%	67%	67%	0%	100%
Loreto	3	Cultivo	1	100%	100%	100%	33%	67%	67%	67%	100%	67%
			2	67%	83%	100%	33%	0%	67%	67%	67%	33%
		Biopsia	1	50%	100%	100%	50%	100%	100%	100%	0%	100%
			2	50%	100%	100%	50%	0%	100%	100%	0%	50%
		Impronta	1	67%	83%	100%	100%	67%	100%	100%	33%	100%
			2	33%	83%	100%	100%	0%	100%	100%	33%	67%
		Raspado	1	50%	100%	100%	50%	50%	50%	100%	50%	100%
			2	50%	100%	100%	50%	0%	50%	100%	0%	50%

Origen	N° muestras	Tipo Muestra Clínica	Alelo	Porcentaje de Amplificación								
				AC5	ARP	LBA	E11	IBH	CAK	LRC	G09	EMI
Madre de Dios	21	Cultivo	1	100%	100%	100%	95%	100%	100%	90%	100%	100%
			2	81%	98%	90%	71%	52%	81%	81%	95%	86%
		Biopsia	1	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	100%
			2	50%	100%	100%	100%	0%	50%	100%	50%	50%
		Impronta	1	58%	87%	79%	42%	37%	63%	84%	42%	79%
			2	58%	87%	68%	16%	42%	68%	63%	47%	68%
		Raspado	1	74%	97%	68%	32%	47%	58%	89%	42%	68%
			2	74%	95%	58%	16%	42%	63%	63%	42%	63%
Ucayali	1	Cultivo	1	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%
			2	0%	100%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	0%
		Biopsia	1	0%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
			2	0%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	0%
		Impronta	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		Raspado	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	53	Total	1	80%	88%	87%	65%	77%	78%	85%	61%	85%
			2	59%	85%	65%	34%	24%	64%	67%	38%	64%

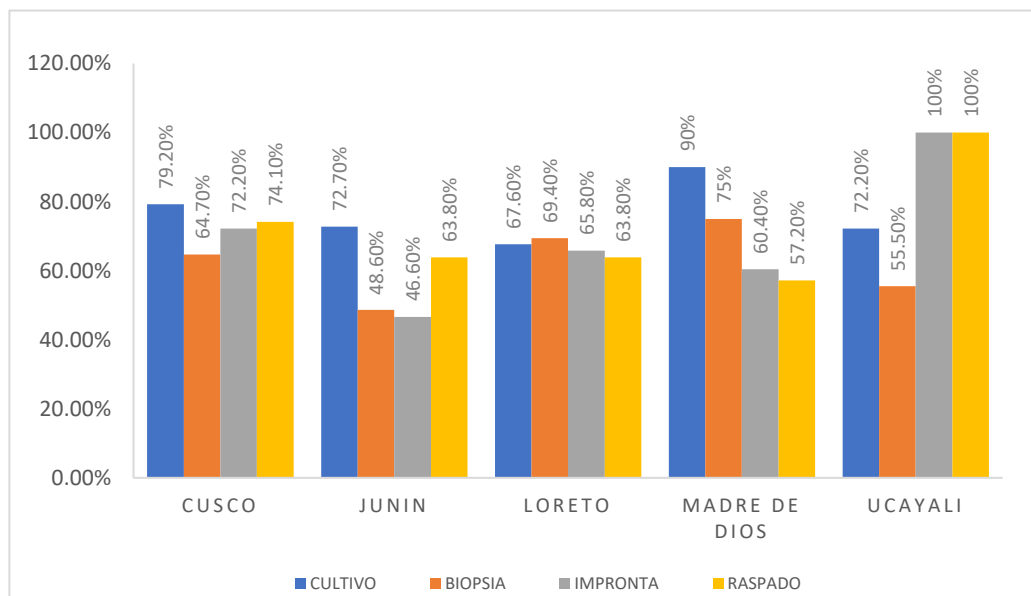


Figura 10: Porcentaje de eficiencia de amplificación promedio global según origen geográfico y tipo de muestra.

5.3 Análisis inferencial

En la Tabla 7, figuras 11 y 12 se observan el número y porcentaje de coincidencias entre el cluster de las muestras clínicas alternativas (Biopsia, improntas y raspados) comparadas con el estándar (cultivo) clasificado según alelos 1 y 2. Se observa que en el Alelo 2 se alcanzó un mayor porcentaje de coincidencias destacando que los resultados del 73% de muestras analizadas de biopsia son similares a las muestras analizadas por cultivo; así mismo, los resultados del 63% de muestras analizadas por papel filtro son similares a las analizadas por cultivo y los raspados presentan 59% de similitud con el cultivo.

Tabla 7: Número y porcentaje de coincidencias entre el cluster de las muestras clínicas alternativas

Muestra clínica alternativa	Alelo	Coincidencia		Total	% Coincidencia	% Coincidencia total
		Si	No			
Biopsia	1	3	19	22	14%	43%
	2	16	6	22	73%	
Impronta (Papel Filtro)	1	11	19	30	37%	50%
	2	19	11	30	63%	
Raspado (Lanceta)	1	9	18	27	33%	46%
	2	16	11	27	59%	

Sin embargo, en el alelo 1 se logra menores niveles de similitud con los resultados de cultivo obteniéndose 14% para biopsia, 37% improntas en papel filtro y 33% por lanceta.

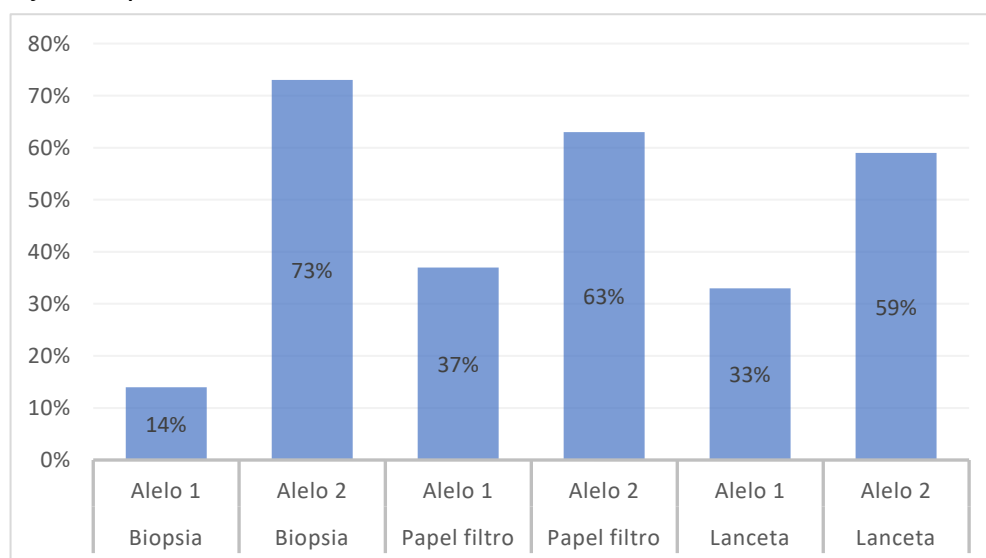


Figura 11: Porcentaje de coincidencias entre el cluster de las muestras clínicas alternativas versus el estándar clasificado según alelos 1 y 2

En la Figura 12 se muestra el porcentaje de coincidencia total (similitud) entre el cluster de las muestras clínicas alternativas (Biopsia, impronta y raspado) versus el estándar (cultivo). Se observa que se logra niveles de similitud 50% para las improntas en papel filtro, seguido de raspados 46% y finalmente 43% de similitud para los resultados de biopsia.

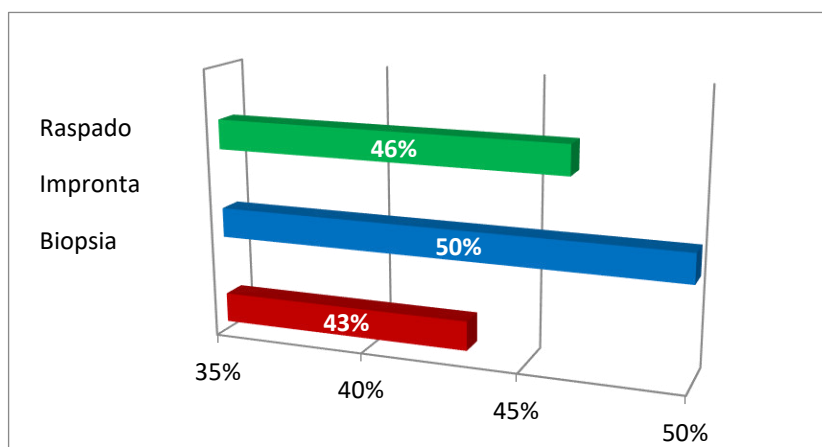


Figura 12: Porcentaje de coincidencia total entre el cluster de las muestras clínicas alternativas con sus respectivas muestras estándar.

5.4 Determinación de la diversidad genética en *L. (V.) braziliensis*

Al realizar una comparación entre los valores de los índices de diversidad genética de *L. (V.) braziliensis*, utilizando los datos obtenidos de los cultivos y la agrupación de datos para las muestras clínicas alternativas, se observó que, a pesar de las diferencias en el número de alelos para cada marcador entre ambos grupos, los promedios del número de alelos tuvieron una diferencia de sólo 0.11.

También, se observó diferencias en las muestras de cultivos y las alternativas, para cada valor de heterocigosidad, ya sea observada (H_O) o esperada (H_E); sin embargo, la diferencia entre los promedios de las H_E fue de sólo 0.001.

Finalmente, el contenido de información polimórfica (PIC) determinó que todos los marcadores usados fueron informativos para la determinación de la variabilidad genética, a pesar de presentar diferencias entre los promedios de PIC de solo 0.002 (Tabla 8).

Tabla 8: Índices de diversidad y PIC de cultivo y muestras clínicas alternativas agrupadas

Marcadores	Cultivos					Muestras clínicas alternativas				
	Alelos	Muestras	H _O	H _E	PIC	Alelos	Muestras	H _O	H _E	PIC
AC52	25	43	0.605	0.955	0.941	23	54	0.722	0.943	0.93
ARP	24	43	0.930	0.929	0.913	30	64	0.922	0.938	0.927
LBA	13	43	0.767	0.887	0.864	13	60	0.833	0.882	0.862
E11	7	41	0.463	0.760	0.710	7	36	0.333	0.714	0.651
Ibh3	8	42	0.167	0.662	0.618	8	60	0.15	0.605	0.576
CAK	13	40	0.800	0.825	0.792	16	53	0.774	0.876	0.856
LRC	21	42	0.643	0.927	0.910	16	62	0.694	0.915	0.9
G09	6	42	0.476	0.616	0.558	6	29	0.483	0.673	0.6
EMI	19	40	0.725	0.896	0.875	18	61	0.77	0.915	0.9
Mean	15.11			0.829	0.798	15.22			0.828	0.800

Debido a las pequeñas diferencias entre los promedios de la H_E y PIC entre los cultivos y agrupamiento de muestras clínicas, se midió el grado de correlación entre estas variables; presentando una fuerte relación (Pearson r : 0.954 y 0.964, ambas con un valor $p < 0.001$; estas diferencias entre H_E y PIC de los nueve marcadores fue graficada y se observó que fue menor del 5% (Figura 13)

Estas diferencias de PIC ratifican que los marcadores AC52, ARP, LBA, LRC y CAK son informativos según los índices de diversidad y contenido de información polimórfica (PIC). Los marcadores IBH3 y G09 muestran ser poco informativos para su uso.

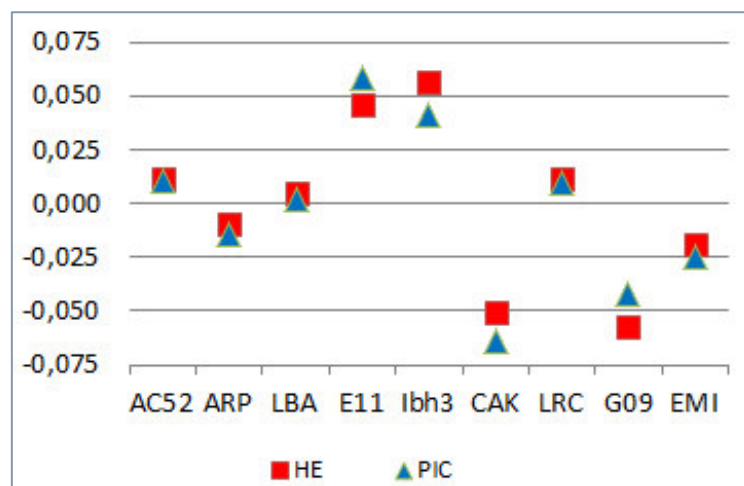


Figura 13: Diferencias de H_E y PIC entre cultivos y otras muestras clínicas alternativas

5.5 Análisis de la estructura poblacional de *L. (V.) braziliensis*

El análisis mediante STRUCTURE asignó los 42 cultivos aislados de *L. (V.) braziliensis* a dos poblaciones, de acuerdo a la derivada del número de posibles poblaciones (ΔK) (Figura 14). En caso de las muestras alternativas no pudo realizarse este análisis por la poca cantidad de muestras.

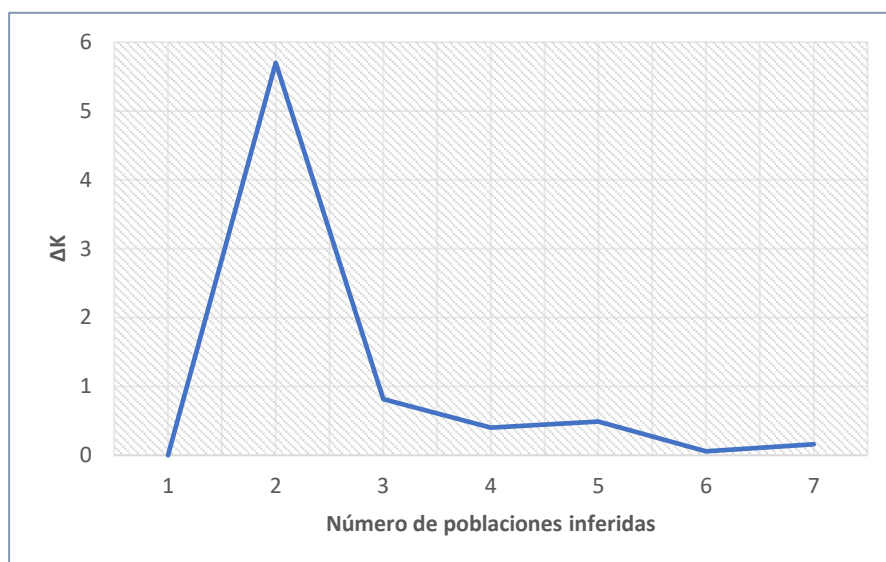


Figura 14: Derivada de número posible de poblaciones para muestras de *L.(V.) braziliensis*. El eje X indica el número de poblaciones inferidas y el eje Y los valores de ΔK . El valor máximo de ΔK sugiere que existen dos sub-poblaciones de *L. (V.) braziliensis*

Una ventaja del software Structure es que permitió realizar un análisis de membresía el cual asoció las dos poblaciones predefinidas con dos regiones geográficas del Perú. El primer grupo estuvo conformado por los cultivos establecidos a partir de los casos clínicos que en los últimos 10 años residieron en Ucayali, Loreto y Madre de Dios (selva baja) y el segundo grupo estuvo conformado por casos que residieron en Cusco y Junín (selva alta o montaña) (Tabla 9). La muestra de Brasil o control positivo en los PCR de los microsatélites, se consideró como el grupo externo (outgroup) y pertenece a una cepa aislada en la costa este de Brasil (Figura 15).

Tabla 9: Proporción de parentesco de las poblaciones geográficas predefinidas

Procedencia de las muestras	Selva Baja	Selva Alta	N° muestras
Loreto	0.995	0.005	3
Ucayali	0.998	0.002	1
Madre de Dios	0.996	0.004	20
Junín	0.144	0.856	14
Cusco	0.506	0.494	4
Brasil (Outgroup)	0.997	0.003	1

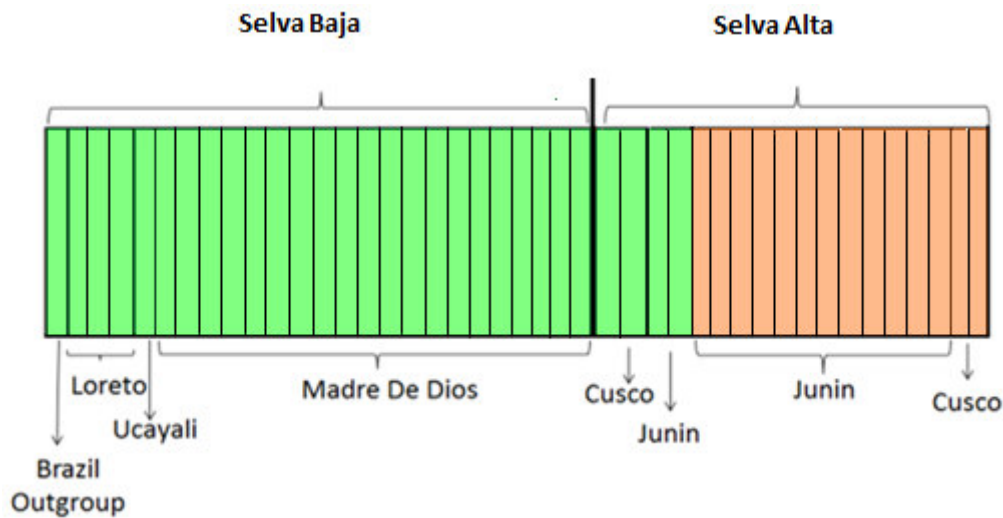


Figura 15: Agrupación genética de las muestras según localización geográfica

Para estructurar las posibles poblaciones usando las muestras de biopsia, impronta y raspado se utilizó el análisis de correspondencia, este análisis fortaleció lo encontrado anteriormente en los cultivos, mostró la representación visual de la relación y variación entre los individuos y los colocó en un espacio tridimensional según el grado de similitud alélica entre ellos. En el caso de las otras muestras alternativas no se pudo inferir la derivada de posibles poblaciones, es por ello que se realizó un análisis de correspondencia para tratar de agrupar a las muestras que presentan alguna similitud (Figura 16-19).

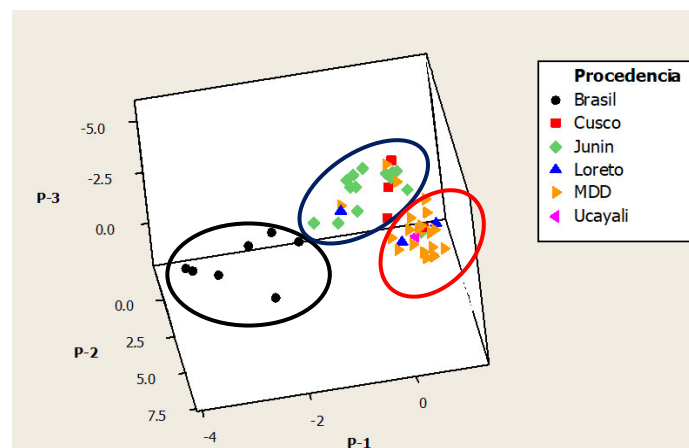


Figura 16: Representación del grado de similitud alélica para cultivos.

Nótese el agrupamiento de las muestras con procedencia de Madre de Dios, Ucayali y Loreto en el círculo rojo y las muestras de Cusco y Junín en círculo azul

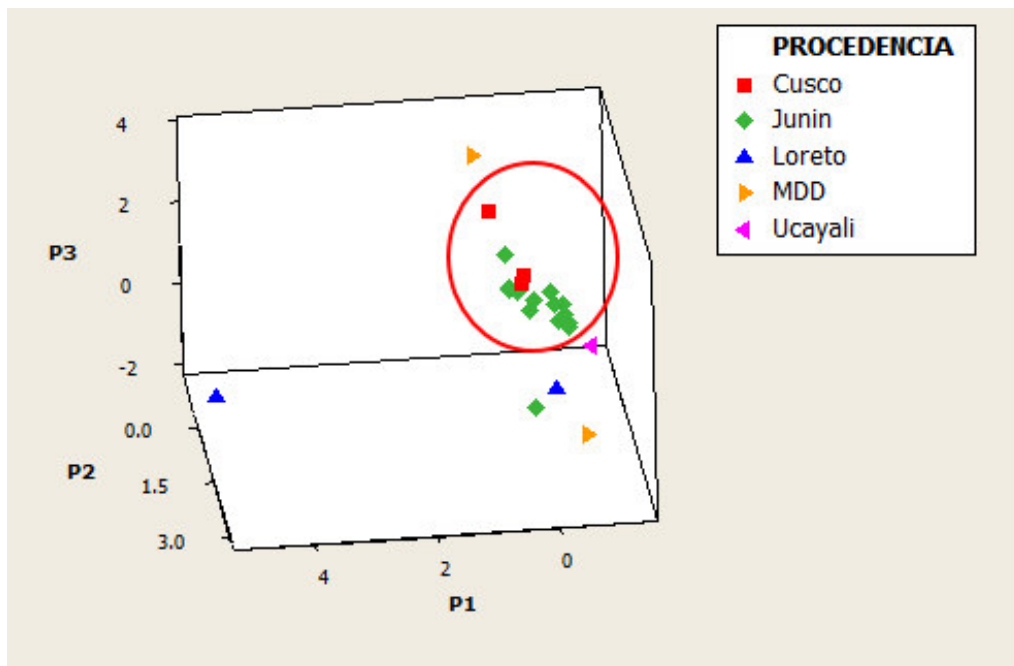


Figura 17: Representación del grado de similitud alélica para biopsias.

Se observa que no existe un agrupamiento diferenciado de las muestras según origen geográfico.

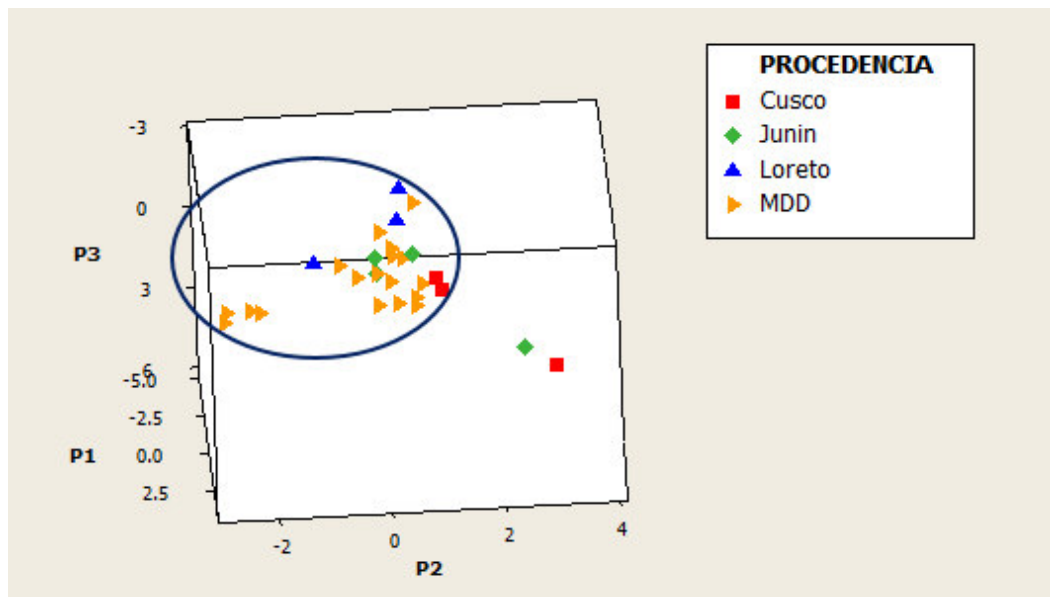


Figura 18: Representación del grado de similitud alélica para muestras de impronta con papel filtro.

Se observa que no existe un agrupamiento diferenciado de las muestras según origen geográfico.

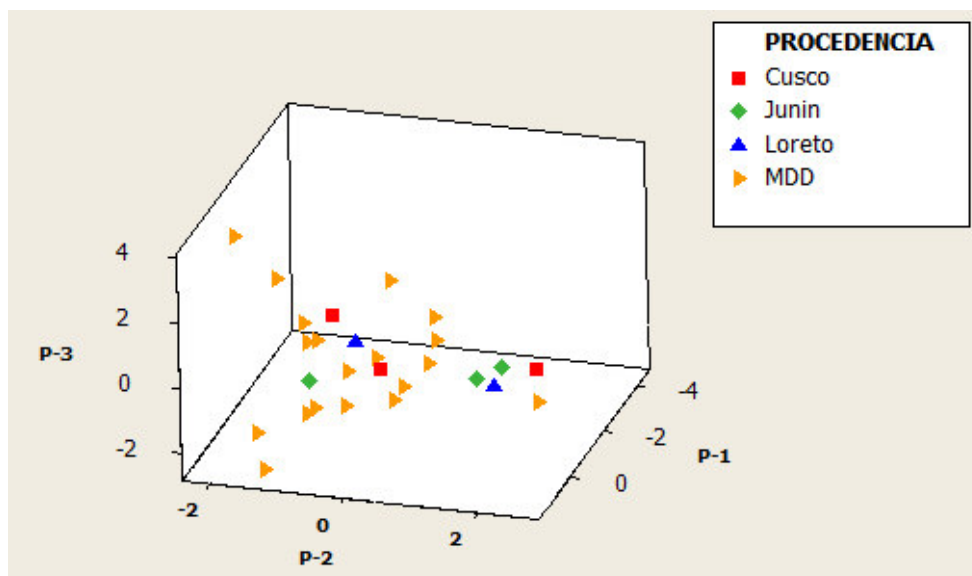


Figura 19: Representación del grado de similitud alélica para raspados con lancetas.

Se puede ver que no existe un agrupamiento diferenciado de las muestras según origen geográfico.

Análisis de agrupamiento poblacional

El análisis de agrupamiento utilizando *Neighborg Joining* permitió disgregar la muestra de Brasil del resto de cultivos. Estos a su vez formaron dos grupos que se correlacionaron con el resultado de STRUCTURE y FCA para los cultivos. De este modo, se observa un grupo constituido por las regiones de Loreto, Ucayali y Madre de Dios (selva baja), y el segundo grupo formado por las regiones Cusco y Junín (selva alta o montaña) como se aprecia en la figura 20.

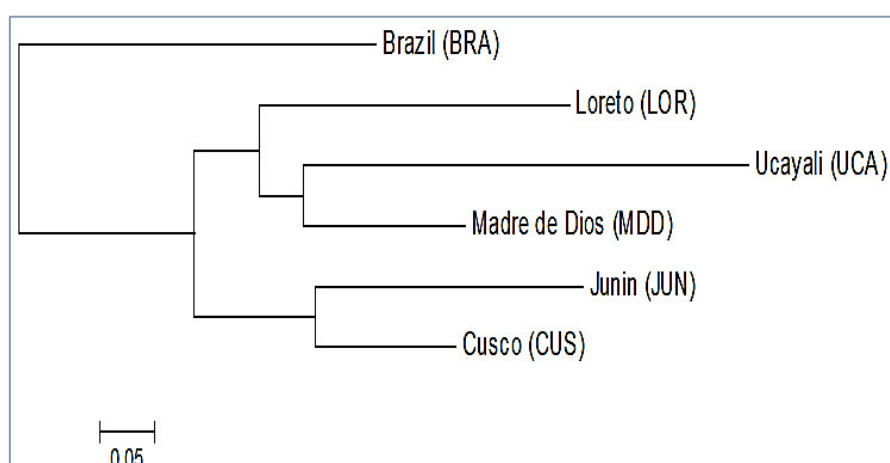


Figura 20: Dendrograma Neighbor Joining basado en la distancia genética de Nei en la población de *L. (V.) braziliensis*, utilizando cultivos.

VI. DISCUSIÓN

En relación a la identificación de fragmentos de la electroforesis capilar, en algunos casos se encontraron varios artefactos en la amplificación de los marcadores microsatélites usando biopsia, impronta, raspado y cultivos que impidieron la correcta obtención de los productos. En este trabajo se realizó una electroforesis capilar de tipo multiplexing. Para evitar la pérdida en la especificidad se realizaron las PCR de forma unitaria para cada una de las muestras con cada uno de los marcadores, luego se tomó como estrategia el agrupamiento en paneles de marcadores según su amplificación teórica y su temperatura de hibridización para evitar la sobreposición de los mismos; siguiendo las indicaciones de la casa comercial de los reactivos Thermo Scientific Inc.

La calidad baja de amplificación de marcadores está relacionada a la producción errática de fragmentos no esperados generando bandas a manera de ruido en el análisis. Según Majumder *et al.*, (2012), estas bandas son generadas por la hibridización de la polimerasa en el proceso de amplificación es por ello que Thermo-Scientific INC, (2014) indica la necesidad de utilizar una enzima con principio *Hot Start*. En nuestro caso se utilizó la enzima Platinum Taq polimerasa que presenta en su composición un anticuerpo que bloquea la actividad de la enzima en temperaturas ambientales, esta actividad es repuesta cuando la temperatura se encuentra en el paso de denaturación a 94 °C incrementando su sensibilidad, especificidad y producto de amplificación. Por otro lado, Guichoux *et al.*, (2011) señalan que estos ruidos de fondo cuando no son muy fuertes nos ayudan a distinguir los alelos verdaderos de los artefactos como ocurre en nuestro análisis se distinguen los alelos verdaderos porque presentan mayor tamaño.

Por otro lado, Gang *et al.*, (2011) indica que la falta de sensibilidad y calidad está asociada al tipo de muestra a utilizar cuando se realiza un estudio con microsatélites. En las muestras como biopsias, improntas y raspados se logró identificar los alelos, es más, en esta investigación se busca conocer si muestras alternativas al cultivo como son biopsias, improntas y raspados pueden ser útiles en este tipo de análisis, debido a la reproducibilidad en los resultados en las

muestras estándar para estudios de variabilidad. Para lo cual, todas las muestras fueron cuantificadas para saber la cantidad y pureza del material genético utilizado.

Alam *et al.*, (2009) señalan, el uso de cultivos como muestras de estudio, pero también el uso de muestras de médula ósea tomadas en papel filtro y en portaobjetos de los cuales se realiza la extracción de material genético, este autor no indica la viabilidad en cuanto a la amplificación de marcadores microsatélites, pero se debe entender cuando se tiene una muestra clínica procedente de un paciente el material que se encuentra con más preponderancia es el ADN humano, pudiendo este enmascarar la cantidad real de ADN del parásito, por lo que se hace necesario su cuantificación.

Es así que Jara *et al.*, (2013), mencionan que la carga parasitaria en muestras de pacientes con lesiones mucosas es menor a aquellos pacientes con lesiones cutáneas, y en el caso del uso de muestras clínicas el número de parásitos es variable debido al número de copias del gen a amplificar descartando el uso de copias de kinetoplasto para estudios epidemiológicos. En este caso se usaron 9 marcadores que amplificaron zonas repetitivas no codificantes del genoma de *Leishmania* previamente probadas en estudios de diversidad genética (Oddone *et al.*, 2009; Russel *et al.*, 1999; Rougeron *et al.*, 2009). Para evitar problemas de uniones inespecíficas causantes de patrones tri o tetraalélicos, Pompanon *et al.*, (2005) señalan que deben verificarse las corridas; en este estudio cuando se tenía alguna inconsistencia se repitieron las corridas y se consideró el alelo más frecuente comparando con los resultados previos de las muestras clínicas del mismo.

Por otro lado, las muestras procedentes de cultivos presentaron el ADN puro del parásito, el cual puede ser cuantificado a diferencia de las muestras obtenidas por biopsia, raspado o impresión donde el material del parásito se encuentra mezclado con el ADN del hospedero; en este caso pacientes con la enfermedad. Al realizar el test de microsatélites puede existir problemas en la amplificación de estos fragmentos cortos, por lo que, se hace necesario conocer la carga parasitaria en estas muestras clínicas (Jara *et al.*, 2013).

El uso de un muestreo no invasivo se ha convertido en una necesidad en el caso de esta parasitosis, ya que se necesita de personal entrenado para la toma de muestra, que se realice de forma rápida y sencilla para facilitar primero, la identificación de especies y posterior aislamiento del material genético para diferentes estudios evitando la contaminación del material biológico ya que, no todas las regiones geográficas pueden preservar los muestreos libres de contaminación; Boggild *et al.*, en el 2010 demostró el uso de muestras alternativas para la identificación y diagnóstico de especies que producen cuadros cutáneos de leishmaniasis demostrando la utilidad de impresiones en papel de filtro frente a raspados y aspirados, obteniendo una sensibilidad del 92.3% con impresiones frente a un 94.2% de sensibilidad usando aspirados y raspados. En el caso de las improntas la especificidad fue del 100% en cambio con los raspados y aspirados ésta disminuyó al 94.2%. Pero en el caso de estudios de diversidad se mostró el uso de pequeñas cantidades de ADN extraído de tejidos de perros con leishmaniasis visceral, para observar la distribución espacial y genética poblacional, al ser comparados con los perfiles de amplificación de aspirados de nódulos linfáticos que amplificaron en 45% de los marcadores (Motoie *et al.*, 2013).

Pocas investigaciones de diversidad genética describen el uso de muestras alternativas, pero en si señalan que la mayoría de estudios solo emplean cultivos procedentes de criobancos reconocidos lo que hace que los resultados no sean variables, ya que el uso de otros tipos de muestra no esta validado. En el presente estudio se quería estimar si las muestras alternativas eran útiles para análisis de diversidad genética frente a los cultivos, determinándose que las improntas presentaron una eficiencia del 50%, raspados 46% y biopsias 43% comparando el trabajo con el de Motoie *et.al* (2013), se observa una mejora en la eficiencia, quiere decir que, en este trabajo se reconoce el alelo de forma específica en un 50%, pero este dato estadístico lleva a analizar que el 50% restante puede llevar a errores en la amplificación dada la cantidad de artefactos que se puedan producir generando errores en la lectura de los alelos ya que no es posible estimar la cantidad y calidad del material genético.

En términos estadísticos se sabe que resultados homogéneos nos permiten predecir las desviaciones máximas entre las muestras clínicas alternativas comparadas con la muestra estándar. A nivel biológico, la mayor variación lleva

a plantear que existen nuevos eventos genéticos que deberían ser analizados en otros estudios.

En un estudio realizado con muestras de Perú y Bolivia, se presentó que la mayor diversidad genética de *L.(V.) braziliensis* ocurre dentro de los dos países más no en los límites fronterizos lo que exhibe que son lugares ecológicamente diferentes. En este estudio, es necesario aclarar la presencia de accidentes geográficos como son las montañas y ríos al diferenciar dos poblaciones circulantes de *Leishmania (V.) braziliensis* en el Perú, ya que, se presenta una zona de ceja de selva con clima cálido, menor altitud y mayor humedad, dependiendo de la estacionalidad, eventos como friaje o presencia de lluvias, frente a las características geográficas presentes en las zonas de selva alta como son los departamentos de Cusco y Junín con mayor altitud, clima variado y humedad que hace posible la adaptación del insecto vector a estas nuevas características; así también, se debe abarcar el aspecto humano en los cuales frecuentemente existen fenómenos de migración y se podría hablar de una coexistencia de cepas presentes en zonas de selva alta y baja. Estos datos apoyan la investigación desarrollada por Rougeron *et al.*, (2009) e Ishikawa *et al.*, (2002) quienes relacionan la diversidad genética de *L.(V.) braziliensis* con la diversidad ecológica presente en el Perú.

Akopyants *et al.*, (2009), demostraron la coexistencia de dos especies en ensayos experimentales inoculando dos cepas de diferentes especies de *Leishmania* por intercambio genético generado en el tracto digestivo del insecto, en este estudio se presentan muestras de Cusco y Junín que presentan un parentesco similar a las muestras de selva baja, no se puede afirmar que se trate de un intercambio genético dentro del hospedero o que se trate de una parasitosis producto de dos subespecies circulantes en Perú. Además, se ha demostrado la presencia de dos poblaciones circulantes de *L.(V.) braziliensis* usando las muestras de cultivo, en el caso de las muestras alternativas no se obtuvo una estructuración poblacional definida por lo que se recurrió al análisis de correspondencia, el cual buscó similitudes entre las muestras alternativas no identificando una población específica.

El análisis Neighbor-Joining encontró semejanza entre las muestras, coincidiendo por lo propuesto por Farris *et.al.* (1996), quien indica que este tipo

de análisis solo refleja el grado de similaridad entre organismos de una especie formando grupos aislados según su nivel de semejanza, más no muestra alguna relación evolutiva entre ellas, por lo que podemos afirmar que existen muestras de *L. (V.) braziliensis* propias de selva alta y de selva baja. Para realizar una identificación filogenética es necesario secuenciar muestras de selva alta y de selva baja, usando la técnica de tipificación de secuencias multilocus (MLST) que utiliza como flancos diagnósticos diferentes genes. Ya, Fraga *et al.*, (2010) señalan el uso de proteínas de shock térmico hsp70 para describir la filogenia del género *Leishmania* identificando tres subgéneros. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio filogenético de *L. (V.) braziliensis* procedentes de humanos, vectores y reservorios para conocer como es la estructuración poblacional de esta cepa en el Perú.

VII. CONCLUSIONES

1. El marcador **ARP** es más eficiente (85.1%), seguido del marcador **LBA** (74.9%), **EMI** (74%), **LRC** (72.6%), **CAK** (67.3%), **AC52** (66.5%). Los marcadores **IBH3**, **E11** y **G09** presentaron una eficiencia de amplificación menor del 50%.
2. Se encontró que las improntas en papel filtro presentan un 50% de eficacia frente a los cultivos indicando que podrían ser útiles para la toma de muestra en sitios alejados, ya que no se contaminan fácilmente y son portables.
3. El análisis estadístico mostró una mayor amplificación en el segundo alelo, indicando que es necesario una evaluación y desarrollo de marcadores con la correcta estandarización.
4. El análisis inferencial mostró que el alelo 2 alcanzó un mayor porcentaje de coincidencia 73% en las muestras analizadas de biopsia; 63% para improntas y 59% en raspados frente a los cultivos.
5. Se determinó la presencia de dos cepas circulantes en el Perú, perteneciente a zonas de selva alta (Junin y Cusco) y selva baja (Loreto, Ucayali y Madre de Dios) utilizando cultivos.
6. Comparando la heterocigocidad observada (H_o) de los cultivos y las muestras alternativas, se observó una diferencia de sólo 0.001, que indica la presencia de una elevada variabilidad.
7. Usando el análisis de correspondencia para las tres muestras (raspados, improntas y biopsias) no se pudo diferenciar las poblaciones.
8. El análisis neihbor-joining mostró la similaridad de las muestras de Ucayali y Madre de Dios y ésta a su vez con las muestras de Loreto, diferenciándolas de las muestras de Cusco y Junin que obtuvieron mayor similitud.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios reemplazando 3 marcadores (E11, IBH3 y G09) poco informativos ya que no aportan datos a los estudios de diversidad.
2. Es necesario cuantificar la carga parasitaria en muestras alternativas para conocer cuál es la máxima detección de parásitos en estudios de variabilidad genética asegurando su reproducibilidad.
3. Se requiere ampliar el número de muestras como biopsias, improntas y raspados para tener un análisis estadístico concluyente.
4. Se sugiere realizar un secuenciamiento completo de las muestras procedentes de selva alta y baja para conocer si se trata de una especie críptica de *Leishmania* (V.) *braziliensis*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akopyants, N., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D., Beverley, Sacks, D. (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 324, 265-268.
- Alam, M., Haralambous, C., Kuhls, K., Gouzelou, E., Dionyssios, S., Soteriadou, K., Schonian, G. (2009). The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes and Infection*, 11, 707-715. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.009>
- Al-Jawabreh, A., D. S., Müller, M., Wirth, T., Schnur, L., Strelkova, M., Schönián, G. (2008). Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania* (*Leishmania*) major by microsatellite analysis. *BMC Evol Biol*, 8, 183. doi:10.1186/1471-2148-8-183.
- Arévalo, J., Ramirez, L., Adahui, V., Zimic, M., Tuliano, G., Miranda-Verástegui, C., & Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of leishmania (*viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 12, 1846-1851. doi:10.1086/518041
- Ashford, R. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1269-1281. doi:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3)
- Bañuls, A.L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1-458. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Barral, A., Costa, J., Bittencourt, A., Barral-Netto, M., & Carvalho, E. (1995). Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, 34(7), 474-479. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb00613.x>
- Boggild, A., Valencia, B., Espinosa, D., Veland, N., Ramos, A., Arevalo, J., Low, D. (2010). Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*, 50(1). doi:10.1086/648730.
- Boité, M., Mauricio, I., Miles, M., & Cupolillo, E. (2012). New insights on taxonomy phylogeny and population genetics of leishmania (*viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi:10.1371/journal.pntd.0001888

- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., & Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* , 314-331.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. 203-266. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x>
- Croft, S., & Coombs, G. (2003). Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19(11), 502-508. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Nehme, N., Hernandez, V., Saravia, N., & Fernandez, O. (2004). Leishmania (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol*, 108(1-2), 59-66.
- Cupolillo, E., Momen, H., Grimaldi, G. (1998). Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 93(5): 663-668, Sep./Oct. 1998
- Cupolillo, E., Aguiar-Alves, F., Brahim, L., Naiff, M., Pereira, L., Oliveira-Neto, M., Grimaldi, G. (2001). Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 57-60. doi:10.1007/s004300100080
- David, C., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22(6), 431-502.
- DGE. (2018). [dge.gob.pe](http://www.dge.gob.pe). Obtenido de http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=154
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics*, 5, 435-445. doi:10.1038/nrg1348
- FAO. (2010). Estado de la cuestion en la gestion de recursos genéticos. 393-416.
- Farris, JS., Albert, VA., Källersjö, M. , Lipscomb, D. and Kluge, AG. (1996), Parsimony jackknifing outperforms Neighbor-Joining. *Cladistics*, 12: 99-124. doi:10.1111/j.1096-0031.1996.tb00196.x
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 238-245. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Gang, HE., Huang, K., Guo, ST., Weihong, JI., XiaoGuang, Qi., Yi, R., XueLin, J., BaoGuo, Li. Evaluating the reliability of microsatellite genotyping from

- low-quality DNA templates with a polynomial distribution model. Chinese Science Bulletin, 56 (24) 2523-2530
- García-Almagro, D. (2005). Leishmaniasis cutanea. Acta dermo-sifilográficas, 96(1), 1-68.
- Garin, Y., Sulahian, A., Pratlong, F. M., & Gangneux, J. P. (2001). Virulence of leishmania infantum is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. Infection and Immunity, 69(12), 7365-7373. doi:10.1128/IAI.69.12.7365-7373.2001
- Ghislain, M., Spooner, D., Rodríguez, F., Villamón, F., Núñez, J., Vásquez, C., Bonierbale, M. (2004). Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theoretical and Applied Genetics, 108(5), 881-890.
- González, U., Pinar, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., & Tweed, J. (2009). Interventions of american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Cochrane Database of Systematic review, 2. doi:10.1002/14651858.CD004834.pub2.
- Goto, H., & Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of anti-infective therapy, 8(4), 49-433. doi:10.1586/eri.10.19
- Grimaldi, G., & Tesh, R. (1993). Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and. Clinical Microbiology Reviews, 6, 230-250.
- Guichoux, E., LAgache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. Molecular ecology resources, 11, 591-611
- Herwaldt, B. (1999). Leishmaniasis. The Lancet, 354, 1191-1199. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2
- Ishikawa, E., FT, S., Magalhães, A., Guerra Jr, R., Melo, M., Gomes, R., Shaw, J. (2002). Genetic variation in populations of Leishmania species in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene, S111-S121.
- Jara, M., Adaui, V., Valencia, B., Martinez, D., Alba, M., Castrillon, C., Arevalo, J. (2013). Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J Clin Microbiol. , 1826-1833.

- Jarne, P., & Lagoda, P. (1996). Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 424-429. doi:[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- Kalinowski, S., Tapper, M., & Marshall, T. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
- Kato, H., Cáceres, A., & Hashiguchi, Y. (2016). First Evidence of a Hybrid of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*/L. (*V.*) *peruviana* DNA Detected from the Phlebotomine Sand Fly *Lutzomyia tejadai* in Peru. *Plos Neglected tropical Diseases*, 1-9.
- Lainson, R., & Shaw, J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, 273, 595-600.
- Langella, O. (1999). Populations 1.2.28 (2002): a population genetic software. Obtenido de <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>.
- Lighthall, G., & Giannini, S. (1992). The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 8(6), 192-199. doi:[https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90263-2)
- López, M., Orrego, C., Cangalaya, M., Inga, R., Arevalo, J. Diagnosis of *Leishmania* via the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49:348–356
- Llopis, J. LA estadística: una orquesta hecha instrumento [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://estadisticaorquestainstrumento.wordpress.com/2012/12/29/tema-17-analisis-de-componentes-principales/>
- Majumder D, Rajesh T, Kipgen TL. Molecular approaches for detection of plant pathogens. *Front Recent Develop Plant Sci* 2012;1:116-136.
- Motoie, G., Ferreira, G., Cupolillo, E., Canavez, F., & Pereira-Chioccia, V. (2013). Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol.*, 48-59.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *CSH Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Navin, T., Arana, B., Arana, F., Berman, J., & Chajón, J. (1992). Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus

- ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases*, 165, 528-34. doi:10.1093/infdis/165.3.528
- Nei, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Neyra, D. (1997). La leishmaniasis en el Perú. *Folia Dermatol Peru*, 8, 51-55.
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C., Llanos-Cuentas, A., & Miles, M. (2007). Multiple hybrid genotypes of leishmania (viannia) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am.J.Trop: Med.Hyg*, 76(3), 573-578.
- Noyes, H., Reyburn, H., Bailey, W., & Smith, D. (1998). A nested PCR based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of leishmania ntropica in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2877-2881.
- Ochsenreither, S., Kuhls, k., Schaar, M., Presber, W., & Schonian, G. (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of Leishmania infantum MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 495-503. doi:10.1128/JCM.44.2.495-503.2006
- Oddone, R., Schweynoch, C., Schonian, G., Cintia, d. S., Cupolillo, E., Espinosa, D., & Kuhls, K. (2009). Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of Leishmania (viannia) species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2818-2825. doi:10.1128/JCM.00645-09
- OMS. (1990). Lucha contra la leishmaniasis. OMS.
- Pearson, R., & Souza, A. d. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 22(1), 1-13.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6(847).
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Ravel, C., Dubessay, P., Britto, C., Blaineau, C., Bastien, P., & Pagès, M. (1999). High conservation of the fine-scale organisation of chromosome 5 between two pathogenic Leishmania species. *Nucleic Acids Research*, 27(12), 2473-2477.
- Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 7, 581-596.

- Rosemberg, N. (2003). distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pagés, M., & Bastien, P. (1994). Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular and biochemical parasitology*, 65, 271-282. doi:[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90078-7)
- Rotureau, B., Ravel, C., Nacher, M., Couppié, P., Curtet, I., Dedet, J. P., & Carme, B. (2006). Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 468-473. doi:[10.1128/JCM.44.2.468-473.2006](https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.468-473.2006)
- Rougeron, V., Bañuls, A., Carme, B., Simon, S., Couppié, P., Nacher, M., De Meeûs, T. (2011). Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*: substantial amount of sex in *Leishmania Viannia guyanensis*. *Mol Ecol*, 20(15), 3116-3127. doi:[10.1111/j.1365-294X.2011.05162.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05162.x). Epub 2011 Jul 1.
- Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Bañuls, A. (2009). Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10224-10229. doi:[10.1073/pnas.0904420106](https://doi.org/10.1073/pnas.0904420106). Epub 2009 Jun 4.
- Rougeron, V., W. E., Hide, M., DE Meeûs, T., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., & Bañuls, A. (2008). PERMANENT GENETIC RESOURCES: A set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensis*. *Mol Ecol Resour.*, 8(2), 351-353. doi:[10.1111/j.1471-8286.2007.01953.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01953.x).
- Russell, R., Iribar, P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J., Dye, C., & Ajioka, J. (1999). Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103, 71-77. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00117-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00117-6)
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Schalling, H., & Linda, O. (2002). Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health*, 7(8), 641-651. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00911.x>

- Schonian, G., Cupolillo, E., & Mauricio, I. (2013). Molecular evolution and phylogeny of leishmania. En D. E.-N. Ponte-Sucre A., Drug Resistance in Leishmania Parasites (págs. 15-44). Vienna: Springer.
- Schonian, Gabrielle; Mauricio, Isabel; Cupolillo, Elisa. (2010). Is it time to revise the nomenclature of Leishmania. Trends in Parasitology, 26, 466-469. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013>
- Schwenkenbecher, J., Wirth, T., Schur, L., Jaffe, C., Schalling, H., Al-Jawabreh, A., & Schonian, G. (2006). Microsatellite analysis reveal genetic structure of leishmania tropica. International Journal for PARasitology, 36, 237-246. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.09.010>
- Scitable. (2014). The Genetic Variation in a Population Is Caused by Multiple Factors. 29/01/2019, de Nature Education Sitio web: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-genetic-variation-in-a-population-is-6526354>
- Shapiro, T. (1993). Inhibition of topoisomerases in African trypanosomes. Acta Tropica, 54(3), 251-260. doi:[https://doi.org/10.1016/0001-706X\(93\)90097-U](https://doi.org/10.1016/0001-706X(93)90097-U)
- Spooner, D., van Treuren, R., & de Vicente, M. (2005). Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin(10).
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol., 1596-1599.
- Tharmatha, T., Gajapathy, K., Ramasamy, R., & Surendran, S. (2017). Morphological and molecular identification of cryptic species in the *Sergentomyia bailyi* (Sinton, 1931) complex in Sri Lanka. Bulletin of Entomological Research, 107(1), 58-65. doi:10.1017/S0007485316000626
- Thermo- Scientific Inc. (2014). DNA Fragment Analysis by capillary electrophoresis. California: Applied Biosystems by life technologies.
- Tibayren, M., & Ayala, F. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends in Parasitology, 18(9), 405-410. doi:[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02357-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02357-7)
- Tibayrenc, M., N. K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D., & Ayala, F. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proc Natl Acad Sci U S A., 90(4), 1335-1339.
- Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. Genome Research, 10(7), 967-981.

- Tsukayama, P., Núñez, J., De Los Santos, M., Soberón, V., Lucas, C., Matlashewski, G., Bacon, D. (2013). A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 7(1), 1956e. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001956>
- Tuon, F., Amato, V., Graf, M., Siqueira, A., Nicodemo, A., & Amato Neto, V. (2008). Treatment of New World cutaneous leishmaniasis-a systematic review with a meta-analysis. *International Journal of Dermatology*, 47(2), 109-124. doi:10.1111/j.1365-4632.2008.03417.x.
- Victoir, K., B. A., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noël, S., Dujardin, J. (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology*, 117, 1-13.
- Vidyashankar, C., Agrawal, R., & Noel, G. (2002). Leishmaniasis. *Emedecine journal*, 3, 1-19.
- WHO. (2007). Report of the fifth consultative meeting on *Leishmania* HIV coinfection.
- WHO. (2010). Control of the leishmaniasis. WHO.
- WHO. (31 de 01 de 2013). Notas descriptivas. Leishmaniasis Recuerado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Williams, J., K. A., Livak, K., Rafalski, J., & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18(22), 6531-6535.

X. ANEXOS

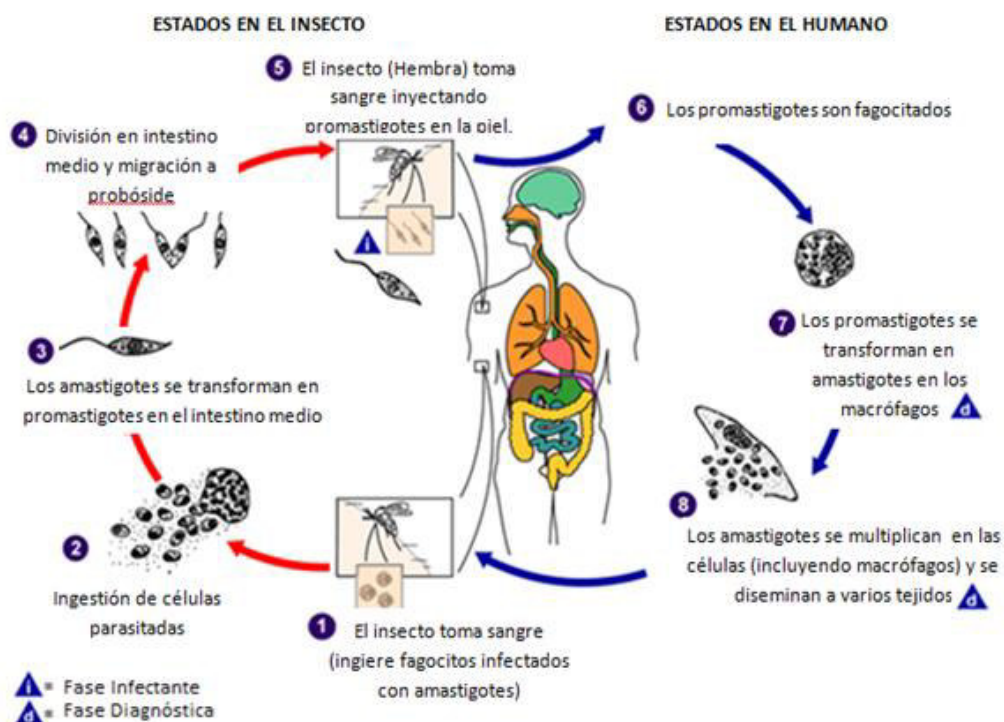
ANEXO 1

Nomenclatura simplificada del género *Leishmania*. Tomado de (Schönian *et.al.*, 2010).

Genus	Subgenus	Species complex	Species included in the hsp70 study, named accordingly to the actual <i>Leishmania</i> nomenclature	Species validated by the hsp70 study
<i>Leishmania</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
			<i>L. infantum</i>	
			<i>L. archibaldi</i>	
			<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
		<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
			<i>L. aethiopica</i>	
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>
			<i>L. amazonensis</i>	
	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. garnhami</i>	
			<i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>
			<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
			<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i>
			<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. peruviana</i>	
	<i>L. (Sauroleishmania)</i>		<i>L. tarentolae</i>	

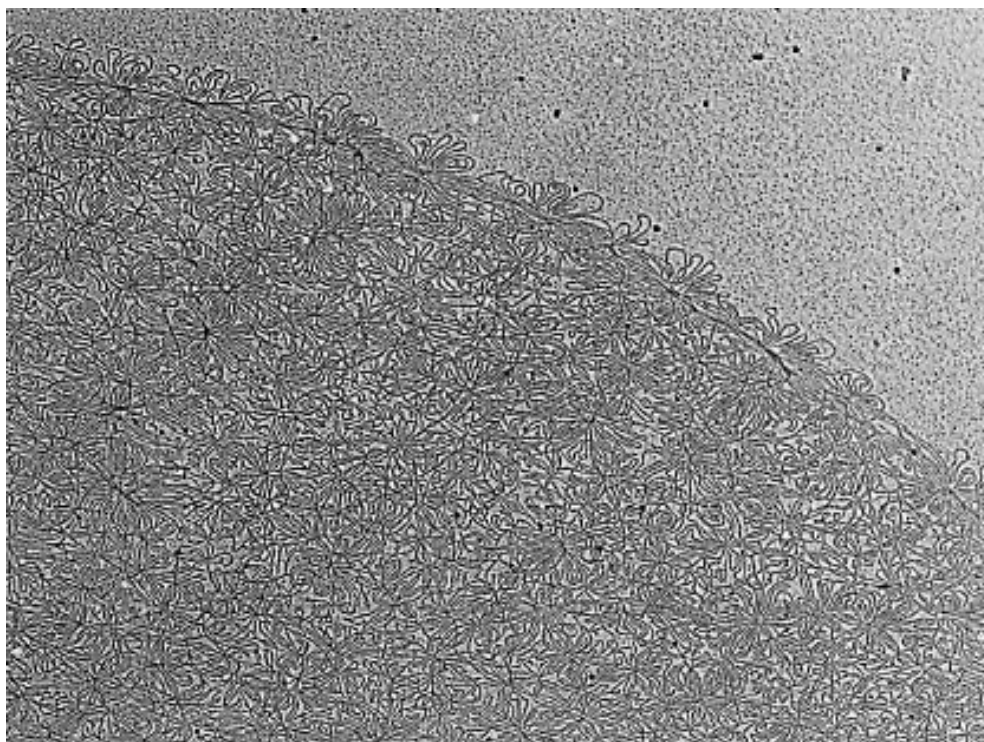
ANEXO 2

Ciclo biológico de *Leishmania* según el Centers for Diseases Control and Prevention (CDC)



ANEXO 3

Microscopia electrónica la cual presenta parte de una red de ADNk de *C. fasciculata*, donde cada bucle pequeño representa un minicírculo de 2.5kb



ANEXO 4

Preparación de medios y reactivos

A. SOLUCION SALINA (0.85%)

Composición.

Cloruro de sodio	0.85g
Agua bi-destilada	100 ml
Gentamicina (10mg/ml)	1ml
5- fluorocitocina (5mg/ml)	1ml

Preparación:

- Pesar 0.85g de cloruro de sodio
- Agregar 100 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.1-7.2
- Esterilizar por medio de autoclave a 15 lb. de presión a 121°C de temperatura por 15 min.
-

B. SOLUCIÓN DE SCHENEIDER

Composición:

Schneiderdrosophila media (LT 11720-034)	35 ml
Suero Fetal Bovino (Sigma F-2442)	15 ml
Gentamicina	0.5 ml

Preparación:

- Utilizar un filtro al vacío colocar el medio Drosophila Schneider.
- Añadir de a pocos el suero fetal bovino
- Finalmente añadir la gentamicina.
- Hacer alícuotas de la preparación en tubos falcon

C. AGAR SENEJKI

Materiales:

Extracto de carne (Difco 212610)	3gr
Bacto peptona (Difco 0118-01-8)	20 gr
Bacto Agar (Difco 214010)	20gr
Cloruro de Sodio	5 gr
Agua BID estilada	1 L

Preparación:

- Disolver el extracto de carne en agua bi destilada y calentar a 56°C por 20 minutos y luego a 80°C por 5 minutos.
- Deje enfriar a 56°C, luego añadir el bacto agar, bacto peptona y el cloruro de sodio.
- Mezcle y caliente los ingredientes en un frasco hasta que el agar se disuelva.
- Deje enfriar a 56°C y ajuste el pH a 7.1-7.2
- Prepare los alícuotas 40 ml en frascos de autoclave y esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión
- En la cabina de bioseguridad añadir 10ml de sangre desfibrinada de conejo
- Colocar 1ml en cada tubo estéril de cultivo (NunclonSurface flat N° 156758) hasta que el agar se enfríe en una posición de pico.

D. BUFFER FOSFATO SALINO (PBS):

Composición:

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	2 g
Fosfato ácido de potasio	0.24 g
Fosfato básico de sodio	1.44 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

- Medir 750ml de agua destilada y mezclar el fosfato básico de sodio hasta su completa dilución.
- Agregar los demás componentes y mezclar bien
- Enrazar a 1000ml.
- Medir el pH a 7.2
- Esterilizar por autoclave por 30 minutos a 15 libras de presión a 121°C.
- Dejar enfriar y guardar en refrigeración.

XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Lamm, R., Alves, C., Perrotta, G., Murphy, M., Messina, C., Sánchez, JF., Pérez, E., Rosales, LA., Lescano, AG., Smith, E., Valdivia, H., Fuhrer, J., Ballard, SB. (2018) "Prevalence of and factor associated with negative microscopic diagnosis of cutaneous leishmaniasis in rural Peru. Am J Trop Med Hyg, 99(2), 331-337 doi: 10.4269/ajtmh.17-09. Que se adjunta a continuación: